

Struktur – Wirkungsbeziehungen von *N*-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor- Untereinheiten

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim
Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Christian Madry
aus Merseburg

Frankfurt am Main 2008
(D30)

Diese Arbeit wurde in der Abteilung Neurochemie am Max-Planck-Institut für Hirnforschung durchgeführt und vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. Heinrich Betz
Prof. Dr. Theo Dingermann

Datum der Disputation: 18. Dezember 2008

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	4
 2. Einleitung	
2.1 Einführung.....	6
2.2 Ionenkanäle – Schlüsselstrukturen der synaptischen Signalübertragung zwischen Nervenzellen.....	7
2.3 Klassifizierung von Glutamatrezeptoren.....	9
2.3.1 Historischer Abriss über die Klonierung von Glutamatrezeptoren.....	9
2.3.2 Grundlegende Charakterisierung ionotroper Glutamatrezeptoren (iGluRs)	10
2.3.3 Räumliche und zeitliche Expression der NMDA-Rezeptor- untereinheiten in Neuronen	12
2.3.4 NMDA-Rezeptoren in Glia.....	12
2.4 Struktur und Funktion von NMDA-Rezeptoren	13
2.4.1 Struktureller Aufbau der Untereinheiten von NMDA-Rezeptoren	13
2.4.2 Grundlegende Prinzipien der NMDA-Rezeptor-Aktivierung	15
2.4.3 Funktionelle Rolle der NR3 Untereinheiten im Rezeptorkomplex.....	16
2.4.4 Funktion der N-terminalen Domäne (NTD) für die Modulation von NMDA-Rezeptoren	17
2.4.5 Strukturelle Aspekte der NMDA-Rezeptor-Aktivierung.....	19
2.5 Physiologische und pathophysiologische Rolle von NMDA-Rezeptoren	20
2.6 Zielsetzung dieser Arbeit.....	23

3. Ergebnisse

3.1 Zusammenfassung von Publikation 1	24
3.2 Zusammenfassung von Publikation 2	29
3.3 Zusammenfassung von Publikation 3	32
3.4 Zusammenfassung von Publikation 4	36

4. Diskussion

4.1 Funktionelle Rolle der NTDs konventioneller NR1/NR2A- und NR1/NR2B-Rezeptoren	41
4.1.1 Einfluss der NTDs auf die Rezeptorsynthese.....	41
4.1.2 Mechanistische Vorstellung der NMDA-Rezeptorsynthese.....	43
4.1.3 Einfluss der NTD auf die Modulation der Rezeptorfunktion.....	43
4.1.4 Modellvorstellung der NTD-vermittelten allosterischen Hemmung.....	44
4.1.5 Beitrag der NTDs zur apparenten Agonistenaffinität.....	46
4.1.6 Physiologische Bedeutung der NTD-vermittelten Effekte.....	47
4.2 Funktionelle Charakterisierung von NR1/NR3-NMDA-Rezeptoren	48
4.2.1 Einfluss der Ligandenbindungsdomänen (LBDs) auf die Aktivierung von NR1/NR3-Rezeptoren.....	48
4.2.2 Modell zum Mechanismus der Glyzinwirkung an NR1/NR3-Rezeptoren	49
4.2.3 Zink ist ein Agonist an NR1/NR3A-Rezeptoren.....	50
4.2.4 Supralineare Potenzierung von NR1/NR3A-Rezeptoren.....	51
4.2.5 Schlussfolgerungen zum Aktivierungsmechanismus von NR1/NR3A-Rezeptoren.....	52
4.2.6 Funktioneller Vergleich zwischen NR1/NR2- und NR1/NR3-NMDA-Rezeptoren.....	54
4.2.7 Physiologische Schlussfolgerungen.....	55
4.3 Schlussfolgerungen und Ausblick	56

5. Literaturverzeichnis.....	59
6. Originalarbeiten	68
6.1 Publikation 1	
6.2 Publikation 2	
6.3 Publikation 3	
6.4 Publikation 4	
7. Kongressbeiträge	102
8. Danksagung	103
9. Lebenslauf inkl. Gesamtpublikationsliste	104

1. Zusammenfassung

Der zur Familie der ionotropen Glutamatrezeptoren gehörende *N*-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor ist maßgeblich an der Weiterleitung erregender Signale zwischen Nervenzellen beteiligt. Er spielt sowohl physiologisch bei z.B. Vorgängen des Lernens oder der Gedächtnisbildung, als auch pathophysiologisch bei neurologischen Erkrankungen eine entscheidende Rolle. NMDA-Rezeptoren sind tetramere Membranproteine, welche aus den homologen NR1-, NR2A-NR2D- sowie NR3A- und NR3B-Untereinheiten aufgebaut sind. Die Untereinheiten sind modular aus jeweils vier verschiedenen Domänen aufgebaut, die spezifische Rollen beim Aufbau und der Funktion der Rezeptoren erfüllen. Konventionelle NR1/NR2-NMDA-Rezeptoren bestehen aus zwei Glyzin-bindenden NR1- und zwei Glutamat-bindenden NR2-Untereinheiten. Sie werden nur durch gleichzeitiges Binden der Agonisten Glutamat und Glyzin effizient aktiviert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Einfluss der extrazellulären N-terminalen Domänen (NTDs) auf die Assemblierung, Funktion und allosterische Modulation von rekombinanten NR1/NR2 NMDA-Rezeptoren mittels biochemischer und elektrophysiologischer Methoden zu untersuchen. Deletionsexperimente zeigten, dass die NTDs von NR1- und NR2A- bzw. NR2B-Untereinheiten die hochaffine, allosterische Zn^{2+} - und Ifenprodil-Hemmung bestimmen, nicht aber für die Bildung funktioneller Rezeptoren von Bedeutung sind. Die NR2-NTDs stellen zusätzlich eine entscheidende strukturelle Determinate für die unterschiedliche Glyzinaffinität von NR1/NR2A- und NR1/NR2B-Rezeptoren dar.

Ein zweiter Aspekt war die funktionelle Charakterisierung von NMDA-Rezeptoren, welche aus NR1- und NR3-Untereinheiten aufgebaut sind. Diese exzitatorischen NR1/NR3-Rezeptoren werden ausschließlich durch den Neurotransmitter Glyzin aktiviert und generieren nur sehr kleine Agonist-aktivierte Ströme im Vergleich zu NMDA-Rezeptoren vom NR1/NR2-Typ. Es

wurde gefunden, dass die Glyzinbindung an die NR1- und NR3-Ligandenbindungsdomänen (LBDs) entgegengesetzte Wirkungen auf die Rezeptorfunktion zur Folge hat. Während die NR3-LBD essentiell für die Aktivierung des Rezeptors ist, bewirkt Glyzin über die NR1-LBD eine Hemmung der NR1/NR3-Rezeptoren. Das erklärt die geringe Effizienz der Rezeptoraktivierung durch Glyzin. Weiterhin zeigen die Ergebnisse zum ersten Mal, dass Zn^{2+} an diesen Rezeptoren als Agonist und positiver Modulator wirkt und in Kombination mit einem NR1-Antagonisten die Glyzin-aktivierten Ströme >120-fach in supralinearer Weise potenzieren kann. Mutationsanalysen ergaben, dass die NR1-LBD für die Zn^{2+} -Aktivierung und –Potenzierung verantwortlich ist. Da die physiologische Rolle von NR1/NR3-Rezeptoren noch nicht eindeutig geklärt ist, könnte die supralineare Potenzierung eine Strategie darstellen, diesen unkonventionellen NMDA-Rezeptor in zukünftigen Untersuchungen besser zu detektieren und zu charakterisieren.

Zusammenfassend liefern die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zu Struktur-Funktionsbeziehungen in NMDA-Rezeptoren auf Ebene der NTDs und LBDs einen wichtigen Beitrag für das Verständnis der Pharmakologie dieser Rezeptorfamilie. Diese Ergebnisse können für die Entwicklung neuer neurologischer Therapeutika genutzt werden.

2. Einleitung

2.1 Einführung

Die Einzigartigkeit des Gehirns zeigt sich oft in banal erscheinenden Dingen, wie z.B. dem Lesen oder Schreiben. Das Gehirn ist in der Lage, Gelerntes dauerhaft zu speichern und bei Bedarf immer wieder zu geben - das einmal gelernte Alphabet vergisst man z.B. sein ganzes Leben lang nicht. Im Gehirn resultieren Lernen und Gedächtnis im Wesentlichen aus der präzisen Wirkweise von Ionenkanälen. Diese Ionenkanäle sind die Grundlage für die Kommunikation zwischen Nervenzellen, da sie chemische Signale in elektrische Signale umwandeln. Vor allem den durch Glutamat aktivierbaren Ionenkanälen bzw. Rezeptoren kommt dabei eine bedeutende Rolle zu. Die vorliegende Arbeit untersuchte Struktur-Wirkungsbeziehungen von ionotropen Glutamatrezeptoren des NMDA-Typs, um dessen Funktionsweise im Gehirn besser zu verstehen.

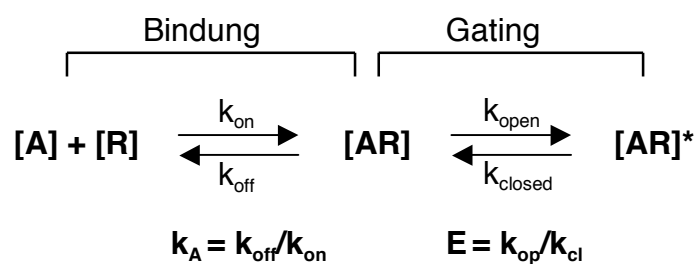
2.2 Ionenkanäle – Schlüsselstrukturen der synaptischen Signalübertragung zwischen Nervenzellen

Nervenzellen kommunizieren untereinander an spezialisierten Kontaktstellen, den Synapsen. Ein in der präsynaptischen Endigung ankommendes Aktionspotential bewirkt dabei die Ausschüttung von Botenstoffen, die nach Diffusion durch den synaptischen Spalt postsynaptische ligandengesteuerte Ionenkanäle aktivieren. Diese wandeln das chemische Signal des gebundenen Neurotransmitters in ein elektrisches um, indem sie die Permeabilität der für Ionen ansonsten undurchlässigen Lipidmembran ändern. Die in die Zelle ein- oder ausströmenden Ionen ändern dabei das über der Membran anliegende Potential, wodurch die Weiterleitung des Signals ermöglicht wird. Neben Änderungen des Membranpotentials können Ionenkanäle auch die Ionenkonzentration der Zelle beeinflussen. Dieses ist besonders für Calcium zutreffend, da dessen intrazelluläre Konzentration durch Puffersysteme sehr klein gehalten wird, um als intrazellulärer Botenstoff fungieren zu können.

Ionenkanäle sind Rezeptorproteine, die über ihren hydrophoben Teil in die Zellmembran eingebettet sind und zentral eine hydrophile, wassergefüllte Pore besitzen, durch die nach Aktivierung der Ionenstrom geleitet wird. In den meisten Fällen lagern sich mehrere einzelne Proteine, die Untereinheiten, zu einem multimeren Komplex zusammen und bilden so den funktionellen Ionenkanal (Übersichten in Hille 1986, 2001). Dessen Aktivierung kann durch Bindung eines Liganden bzw. Neurotransmitters (ligandengesteuerte Ionenkanäle), mechanische Reize (mechanosensitive Ionenkanäle) oder Änderungen der Membranspannung (spannungsabhängige Ionenkanäle) herbeigeführt werden. Diese Reize lösen alle ein elektrisches Signal in der Zielzelle aus, wodurch letztendlich eine biochemische Reaktion hervorgerufen werden kann.

Die Aktivierung eines ligandengesteuerten Ionenkanals lässt sich vereinfacht durch zwei eng aneinander gekoppelte Teilprozesse beschreiben: der Bindung des Agonisten an den geschlossenen Rezeptor und den darauf folgenden

Übergang in den offenen, also Ionen-leitenden Zustand (Del Castillo und Katz 1957). Das Binden eines Agonisten [A] mit dem Rezeptor [R] (bzw. Ionenkanal) führt zu dem noch geschlossenen Übergangszustand [AR] und wird durch die Gleichgewichtskonstante k_A und die Geschwindigkeitskonstanten k_{on} sowie k_{off} beschrieben. Darauf folgt die Umlagerung des Kanalproteins in den offenen Zustand [AR]*, was auch als *Gating* bezeichnet wird. Dieser Teilprozess wird durch die Gleichgewichtskonstante E und die Geschwindigkeitskonstanten k_{open} sowie k_{closed} ausgedrückt.



Jeder Ionenkanal besitzt mindestens einen Offenzustand sowie einen oder mehrere geschlossene Zustände. Diese einzelnen Konformationen stellen energetisch betrachtet relativ stabile Rezeptorzustände dar. Bei vielen Ionenkanälen ist der Offenzustand aber nicht dauerhaft stabil, so dass der Ionenkanal trotz gebundenen Agonisten wieder schließt und in einen energetisch günstigeren Zustand, den desensitisierten Zustand, übergeht (Katz und Thesleff 1957). Solange der Agonist gebunden ist, bildet sich ein Gleichgewicht zwischen dem Offenzustand und dem desensitisierten Zustand aus. Das Schließen des Kanals nach Abdiffundieren des Agonisten wird als Deaktivierung bezeichnet und führt den Rezeptor zurück in den geschlossenen, unligandierten Ausgangszustand.

2.3 Klassifizierung von Glutamatrezeptoren

Der wichtigste erregende Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (ZNS) ist die Aminosäure L-Glutamat. Sie aktiviert Glutamatrezeptoren (Übersicht in Dingledine et al. 1999), die sich in zwei Hauptklassen einteilen lassen: solche, die Ionenkanäle direkt steuern (ionotrope Glutamatrezeptoren), und andere, die indirekt über *Second Messenger* (metabotrope Glutamatrezeptoren) wirken. Die ionotropen Glutamatrezeptoren setzen sich aus vier Untereinheiten zusammen und werden aufgrund selektiv bindender Liganden nochmals in zwei Haupttypen unterteilt: die NMDA-Rezeptoren, welche von dem Glutamatanalogon *N*-Methyl-D-Aspartat (NMDA) aktiviert werden, und die non-NMDA-Rezeptoren, die durch α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure (AMPA), Kainat und Quisqualat aktiviert werden (Abb. 1).

2.3.1 Historischer Abriss über die Klonierung von Glutamatrezeptoren

Glutamatrezeptoren konnten erst relativ spät erfolgreich kloniert werden. Probleme bereitete vor allem die Tatsache, dass im Gegensatz zu anderen Ionenkanälen, wie z.B. den nikotinischen Azetylcholinrezeptoren, keine Liganden bekannt waren, die mit hoher Spezifität und Affinität fest an diese Rezeptorproteine binden (Ballivet et al. 1982, Giraudat et al. 1982). Erst durch die Einführung einer neuen Methode, der Expressionsklonierung, konnte 1989 die cDNA für die Glutamatrezeptoruntereinheit GluR1 isoliert werden (Hollmann et al. 1989). Diese Technik hat den Vorteil, daß keine spezifischen Liganden oder Antikörper bereits vorliegen müssen. Stattdessen wird das Zielprotein nach heterologer Expression, z.B. in Oozyten des südafrikanischen Krallenfroschs, hinsichtlich charakteristischer, funktioneller Eigenschaften untersucht. Diese Methode führte kurze Zeit später auch bei der Klonierung der ersten NMDA-Rezeptoruntereinheit NR1 zu Erfolg (Moryoshi et al. 1991) und bedeutete die Grundlage für die Klonierung aller weiteren Glutamatrezeptoruntereinheiten durch Homologie-Screening (Übersichten in Hollmann und Heinemann 1994, Mori und Mishina 1995).

2.3.2 Grundlegende Charakterisierung ionotroper Glutamatrezeptoren (iGluRs)

NMDA-Rezeptoren sind aus sieben verschiedenen Untereinheiten (NR1, NR2A-NR2D, NR3A, NR3B) aufgebaut, wobei von der NR1 mRNA durch alternatives Spleißen acht verschiedene Spleißvarianten gebildet werden können (NR1-1a – NR1-4b) (Abb. 1) (Monyer et al. 1994). Jede dieser Untereinheiten wird durch ein separates Gen kodiert. Für die Expression funktioneller NMDA-Rezeptoren müssen grundsätzlich zwei NR1-Untereinheiten im tetrameren Komplex (Rosenmund et al. 1998) vorliegen. Diese werden durch NR2 und/oder NR3 Untereinheiten ergänzt, woraus eine Vielzahl verschiedener Kombinationen resultiert. Als funktionelle Einheit wird dabei ein NR1/NR2 bzw. NR1/NR3 Heterodimer angesehen (Furukawa et al. 2005, Chen und Wyllie 2006). Entscheidend für die pharmakologischen und biophysikalischen Eigenschaften der NMDA-Rezeptoren ist die im Rezeptorkomplex eingebaute Isoform der NR2-Untereinheit, welche z.B. die Agonistenaffinität oder die Einzelkanalleitfähigkeit des entsprechenden Rezeptors grundlegend bestimmt (Übersichten in Dingledine et al. 1999, Wollmuth und Sobolevsky 2004). NMDA-Rezeptoren leiten neben Natrium- und Kalium- auch in hohem Maße Calciumionen (Ca^{2+}) (Mayer und Westbrook 1987, Ascher und Nowak 1988), was entscheidend für die Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger *Second Messenger* Kaskaden ist. Die dadurch ausgelösten biochemischen Veränderungen spielen eine entscheidende Rolle für die Gedächtnisbildung und Lernprozesse (Übersicht in Cooke und Bliss 2006). Obwohl NMDA-Rezeptoren durch die Erzeugung elektrischer Impulse zur erregenden Signalübertragung beitragen, besteht ihre Hauptfunktion eher in der aktivitätsabhängigen Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und somit der Regulation Ca^{2+} -abhängiger Prozesse.

Non-NMDA-Rezeptoren sind nichtselektive Kationenkanäle, die aus den Untereinheiten GluR1-GluR7 bestehen (Übersicht in Hollmann und Heinemann 1994). Während sich AMPA-Rezeptoren aus den Untereinheiten GluR1-GluR4 zusammensetzen, werden Kainatrezeptoren durch die Untereinheiten GluR5-

GluR7 gebildet (Abb. 1). Der durch diese Rezeptoren vermittelte Strom wird hauptsächlich von Natrium- und Kaliumionen getragen, einige Subtypen besitzen aber auch eine geringe Leitfähigkeit für Calciumionen (Mayer und Westbrook 1987). Die non-NMDA-Rezeptoren, speziell die des AMPA-Typs, sind für die schnelle Komponente des postsynaptischen Stroms verantwortlich und tragen unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich zur Weiterleitung erregender Signale im Gehirn bei.

Für den aus zwei Untereinheiten bestehenden Delta-Subtyp (Araki et al. 1993) sind bisher keine Agonisten bekannt, so dass er auch als „Waisen-Rezeptor“ in der Literatur bezeichnet wird (Übersicht in Yuzaki 2003). Prokaryontische Kationenkanäle wie der GluR0 stellen eine evolutionäre Verbindung zwischen Kaliumkanälen und Glutamatrezeptoren dar (Chen et al. 1999).

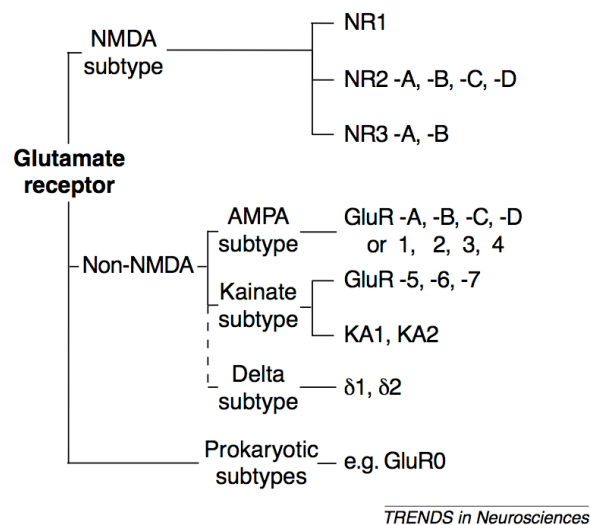


Abb.1 Verwandtschaftsschema ionotroper Glutamatrezeptoren. Jeder Subtyp setzt sich aus verschiedenen Isoformen (Untereinheiten) zusammen, die jeweils durch ein separates Gen kodiert werden. Eine Vermischung der Untereinheiten zwischen verschiedenen Subtypen ist nicht bekannt. NMDA-Rezeptoren sind tetramere Komplexe, die NR1 und/oder NR2 Untereinheiten enthalten müssen, um funktionelle Kanäle zu bilden. AMPA- und Kainat-Rezeptoren sind sowohl als homomere als auch heteromere Komplexe funktionell. KA1 und KA2 bilden nur dann funktionelle Kanäle, wenn sie sich mit anderen Kainatrezeptor-Untereinheiten zusammenlagern.

(nach Wollmuth und Sobolevsky 2004)

2.3.3 Räumliche und zeitliche Expression der NMDA-Rezeptoruntereinheiten in Neuronen

In-situ Hybridisierungsstudien haben gezeigt, dass die Verteilung der mRNAs der jeweiligen NMDA-Rezeptoruntereinheiten im ZNS sowohl entwicklungsabhängig als auch räumlich große Unterschiede aufweist (Watanabe et al. 1993, Monyer et al. 1994, Übersicht in Köhr 2006). Die mRNA der NR1-Untereinheit ist schon früh in der Embryonalentwicklung nachweisbar (Ratte ab etwa Embryonaltag 14) und im adulten Stadium universell in nahezu allen Neuronen vorhanden. Demgegenüber sind die Transkripte für die vier NR2-Untereinheiten unterschiedlich im ZNS verteilt. In vielen Prinzipalneuronen sind die NR2B- und NR2D-Untereinheiten bereits in frühen Stadien der Entwicklung exprimiert, während die Transkripte der NR2A oder NR2C Gene schrittweise ab dem Zeitpunkt der Geburt hinzukommen. Im adulten Gehirn ist die NR2A-Untereinheit universell im ZNS vorhanden, während die Expression der NR2B-Untereinheit auf das Vorderhirn begrenzt ist und die NR2C-Untereinheit in hohem Maße im Kleinhirn angereichert ist (Monyer et al. 1994). Weitaus geringer ist die NR2D-Untereinheit im ZNS exprimiert; sie wird hauptsächlich im Thalamus und Hypothalamus gefunden. Die Expression des NR3A Gens erreicht in frühen Entwicklungsstadien ihr Maximum, fällt ab der ersten postnatalen Woche wieder ab und bleibt im adulten Stadium in den meisten Hirnregionen auf niedrigem Niveau bestehen (Ciabarra et al. 1995, Sucher et al. 1995, Müller und Meador-Woodruff 2005, Henson et al. 2008). Im Gegensatz dazu setzt die Expression der NR3B-Untereinheit erst nach der Geburt ein und ist im adulten Stadium auf Motoneurone des Rückenmarks begrenzt (Nishi et al. 2001).

2.3.4 NMDA-Rezeptoren in Glia

Lange Zeit nahm man an, dass Glutamatrezeptoren, vor allem die des NMDA-Typs, ausschließlich in Neuronen exprimiert sind. In der letzten Zeit haben jedoch einige Studien gezeigt, dass funktionelle NMDA-Rezeptoren auch in Glia, speziell in Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia vorkommen

(Schipke et al. 2001, Karodittir et al. 2005, Lalo et al. 2006, Übersicht in Verkhratsky und Kirchhoff 2007). In Oligodendrozyten wurden sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene die NR1-, NR2A-2D- und NR3A-Untereinheiten nachgewiesen (Karodittir et al. 2005, Salter und Fern 2005, Micu et al. 2006). Gliale NMDA-Rezeptoren scheinen ein spezielles pharmakologisches Profil zu besitzen, was vermutlich auf die Anwesenheit von NR3-Untereinheiten im Rezeptorkomplex zurückzuführen ist (siehe folgende Kapitel). Während NMDA-Rezeptoren in Astrozyten direkt an der synaptischen Signalübertragung zwischen Neuronen und Glia beteiligt zu sein scheinen (Lalo et al. 2006), spielen sie in Oligodendrozyten wahrscheinlich eine wichtige Rolle für Myelinisierungsprozesse (Micu et al. 2006).

2.4 Struktur und Funktion von NMDA-Rezeptoren

2.4.1 Struktureller Aufbau der Untereinheiten von NMDA-Rezeptoren

Alle Untereinheiten von NMDA-Rezeptoren bzw. iGluRs besitzen einen einheitlichen modularen Aufbau bestehend aus vier funktionell unterschiedlichen Regionen (Abb. 2 und 3; Hollmann und Heinemann 1994, Übersicht in Madden et al. 2002). Im extrazellulären Bereich werden die N-terminale Domäne (NTD) sowie die Ligandenbindungsdomäne (LBD) unterschieden, deren Aminosäuresequenzen zu zwei Familien bakterieller Bindeproteine homolog sind (Nakanishi et al. 1990, O'Hara et al. 1993, Armstrong et al. 1998), was einen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung nahe legt. Die NTD (Abb. 2, rot) spielt vermutlich bei der Aktivierung, Desensitisierung sowie der Synthese des Rezeptors eine entscheidende Rolle. In den NTDs von NR2A- und NR2B-Untereinheiten sind zusätzlich Bindungsstellen für allosterische Inhibitoren wie z.B. Zinkionen (Zn^{2+}) und Ifenprodil (siehe nachfolgende Kapitel) enthalten. Die LBD (Abb. 2, orange) setzt sich aus den Subdomänen S1 (oder D1) und S2 (oder D2) zusammen und bindet Agonisten in einem Venus-Fliegenfallen-ähnlichen Mechanismus (Mano et al. 1996). Dabei bindet Glyzin an die LBDs der NR1- und NR3-Untereinheiten

(Kuryatov et al. 1994, Yao und Mayer 2006), während Glutamat an die LBD der NR2-Untereinheiten bindet (Laube et al. 1998). In der darauf folgenden Transmembrandomäne (TMD; Abb. 2, blau) durchspannt die Aminosäurekette in den Bereichen M1, M3 und M4 dreimal die Zellmembran. Eine weitere in die Membran eindringende Schleife (M2), welche strukturelle Ähnlichkeit zu spannungsabhängigen Kaliumkanälen besitzt, bildet in Verbindung mit den übrigen Untereinheiten die Pore des Ionenkanals. Diese Rezeptorregion ist in allen NR-Untereinheiten hochkonserviert und bestimmt die Permeationseigenschaften von NR1/NR2-Rezeptoren, wie z.B. Ionenselektivität oder Einzelkanalleitfähigkeit, sowie die Affinität der als Kanalblocker wirkenden Magnesiumionen (Übersicht in Wollmuth und Sobolevsky 2004). Im intrazellulären Bereich vermittelt eine lange C-terminale Domäne (CTD; Abb. 2, gelb) die Verankerung des Rezeptors mit membranassoziierten Gerüstproteinen und Proteinen, welche die Signalübertragung steuern.

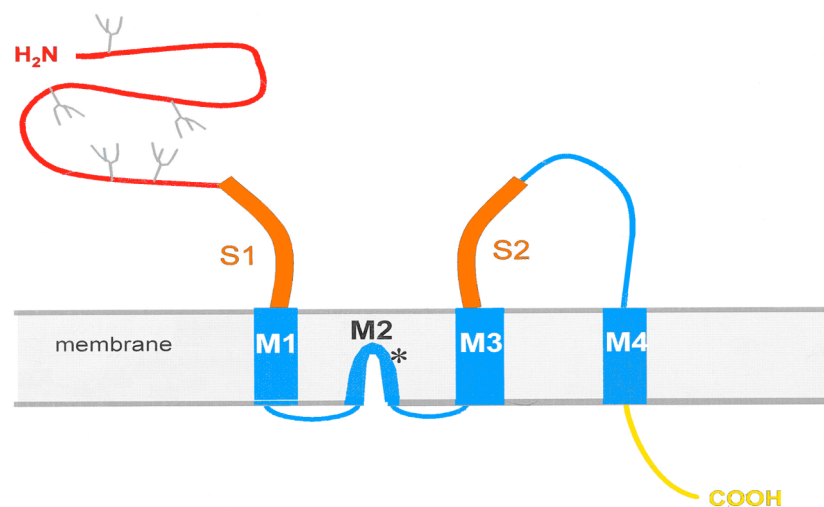


Abb. 2. Struktureller Aufbau einer NMDA-Rezeptoruntereinheit. Die N-terminale Domäne (NTD, rot) und die Ligandenbindungsdomäne (LBD, orange), bestehend aus den Subdomänen S1 und S2, sind extrazellulär orientiert. Die Membrantopologie mit den Membrandurchspannenden Bereichen M1, M3 und M4 sowie der Wiedereintrittsschleife M2 sind in blau dargestellt. Die intrazelluläre C-terminale Domäne (CTD) ist gelb hervorgehoben. Graue astartige Strukturen in der NTD symbolisieren mögliche Glykosylierungsstellen.

(nach Dingledine et al. 1999)

2.4.2 Grundlegende Prinzipien der NMDA-Rezeptor-Aktivierung

NMDA-Rezeptoren besitzen bemerkenswerte Aktivierungseigenschaften, die sie von anderen Mitgliedern der Familie ligandengesteuerter Ionenkanäle unterscheiden. Bei physiologischen Membranpotentialen (von ca. -90 bis -65 mV) ist der Ionenkanal durch spannungsabhängig gebundene Magnesiumionen (Mg^{2+}) blockiert (Abb. 3) (Nowak et al. 1984). Das Öffnen des Ionenkanals erfordert neben dem Binden der Agonisten Glutamat und Glyzin (Johnson und Ascher 1987) zusätzlich eine gleichzeitig stattfindende Depolarisierung der Nervenzellmembran (Mayer und Westbrook 1987, Ascher und Nowak 1988). Letzteres wird hauptsächlich durch Aktivierung benachbarter non-NMDA-Rezeptoren erreicht und ist nötig, um den spannungsabhängigen Mg^{2+} -Block aufzuheben. Da nur das zeitgleiche Eintreten dieser Ereignisse NMDA-Rezeptoren aktivieren kann, bezeichnet man sie auch als Koinzidenzdetektoren. Glutamat, das aus präsynaptischen Vesikeln freigesetzt wird, ist dabei als Hauptagonist anzusehen, während das extrazellulär vorkommende Glyzin als Ko-Agonist dient (Johnson und Ascher 1987).

Der hier beschriebene Aktivierungsmechanismus bezieht sich auf Rezeptoren, die aus den Glyzin-bindenden NR1- und Glutamat-bindenden NR2-Untereinheiten aufgebaut sind. Werden die NR2-Untereinheiten durch NR3-Untereinheiten ersetzt, entstehen NR1/NR3-„NMDA“-Rezeptoren, die durch das Fehlen von Glutamat-bindenden NR2-Untereinheiten allein durch Glyzin aktivierbar sind und folglich einen „exzitatorischen Glyzinrezeptor“ darstellen (Chatterton et al. 2002).

2.4.3 Funktionelle Rolle der NR3-Untereinheiten im Rezeptorkomplex

Die Glyzin-bindenden NR3A- und NR3B-Untereinheiten sind die zuletzt entdeckten NMDA-Rezeptoruntereinheiten (Ciabarra et al. 1995, Sucher et al. 1995, Nishi et al. 2001). Koexpression mit NR1-Untereinheiten resultiert in den einfachsten Vertretern NR3-Untereinheiten enthaltender Rezeptoren, welche nur durch Glyzin aktiviert werden. In heterologen Expressionssystemen konnte gezeigt werden, dass diese exzitatorischen Rezeptoren nur sehr kleine und schnell desensitisierende Ströme generieren, die kaum Ca^{2+} leiten und nicht durch Glutamat oder Glutamatanaloga oder Kanalblocker wie Mg^{2+} und MK-801 beeinflusst werden (Chatterton et al. 2002, Matsuda et al. 2003, diese Arbeit). Damit unterscheiden sie sich grundlegend von den aus NR1- und NR2-Untereinheiten zusammengesetzten „konventionellen“ NMDA-Rezeptoren. Die physiologische Bedeutung dieser NR1/NR3-Rezeptoren ist allerdings noch nicht eindeutig geklärt (Chatterton et al. 2002, Matsuda et al. 2003, Tong et al. 2008) und wird derzeit intensiv beforscht.

Alternativ kann die NR3-Untereinheit auch nur eine der beiden NR2-Untereinheiten im tetrameren Rezeptorkomplex ersetzen, was in Rezeptoren bestehend aus NR1-, NR2- und NR3-Untereinheiten resultiert. Die Anwesenheit der NR3-Untereinheit führt bei diesen Rezeptoren im Vergleich zum konventionellen NR1/NR2-Typ zu einer verringerten Einzelkanalleitfähigkeit, Ca^{2+} -Permeabilität und Mg^{2+} -Sensitivität sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Das et al. 1998, Nishi et al. 2001, Perez-Otano et al. 2001, Sasaki et al. 2002, Matsuda et al. 2003, Tong et al. 2008). Übereinstimmend mit dem dominant-negativen Einfluss der NR3-Untereinheiten auf die Rezeptorfunktion zeigen NR3A Knockout-Mäuse einen größeren NMDA-vermittelten Strom sowie eine höhere Oberflächendichte von dendritischen Dornen an Nervenzellen der Hirnrinde (Das et al. 1998).

2.4.4 Funktion der N-terminalen Domäne (NTD) für die Modulation von NMDA-Rezeptoren

Die Analyse der funktionellen Rolle der NTD stellt einen Hauptaspekt der vorliegenden Arbeit dar. Daher wird diese Rezeptorregion im Folgenden ausführlicher vorgestellt.

Die Aktivität von NMDA-Rezeptoren kann durch eine Vielzahl endogener und synthetischer Liganden moduliert werden (Übersichten in Herin und Aizenman 2004, Huggins und Grant 2005). Es wird angenommen, dass sich die Bindungsstellen dieser Modulatoren in den NTDs befinden. Aufgrund der Sequenzhomologie zu dem bakteriellen **Leucin-, Isoleucin- und Valin-bindenden Protein** (siehe Kapitel 1.3.1) wird diese etwa 400 Aminosäuren umfassende Region auch als LIVBP-ähnliche Domäne bezeichnet.

Protonen bewirken eine tonische Hemmung von NMDA-Rezeptoren, die unter physiologischen pH-Bedingungen bis zu 50 Prozent betragen kann. Für diesen Effekt wird die NR1-1a-Untereinheit verantwortlich gemacht, da die NR1-1b-Untereinheit nicht pH-abhängig inhibiert wird. Beide NR1-Spleißvarianten unterscheiden sich durch die Anwesenheit eines zusätzlichen Exons (Exon 5) in der NTD der NR1-1b-Untereinheit. Hierbei scheinen mehrere Histidinreste dieses etwa 50 Aminosäuren umfassenden Bereiches für die Aufhebung der pH-abhängigen Hemmung verantwortlich zu sein (Traynelis et al. 1995). Weiterhin wurde berichtet, dass Polyamine, wie z.B. Spermin, die Protonen-vermittelte Hemmung NR1a-enthaltender Rezeptoren unterbinden (Traynelis et al. 1995). Mutationsstudien haben nahe gelegt, dass die Bindungsstelle der Polyamine in der NR1-NTD lokalisiert ist (Masuko et al. 1999).

Ein weiterer bedeutender Modulator ist das zweiwertige Kation Zink (Zn^{2+}), das die Agonist-aktivierten Ströme von NR1/NR2A- oder NR1/NR2B-Rezeptoren allosterisch hemmt (McBain und Mayer 1994). Zn^{2+} bindet mit einer Affinität im nanomolaren Konzentrationsbereich an die NTD der NR2A-Untereinheit (Choi und Lipton 1999, Paoletti et al. 2000) und mit einer > 100-fach geringeren

Affinität auch an die NTD der NR2B-Untereinheit (Rachline et al. 2005) (Abb. 3). Die hochaffine Zn^{2+} -Hemmung von NR1/NR2A-Rezeptoren ist allerdings unvollständig (40-80%) und wird durch einen niedrigen pH-Wert verstärkt (Chen et al. 1997, Paoletti et al. 1997, Low et al. 2000). Mechanistisch scheint die Zn^{2+} -Wirkung auf einer verstärkten Desensitisierung der Rezeptorströme zu beruhen (Chen et al. 1997, Krupp et al. 1998, Zheng et al. 2001, Gielen et al. 2008). Da Zn^{2+} an einigen glutamatergen Synapsen vesikulär freigesetzt wird (Übersicht in Frederickson et al. 2005), scheint die Zn^{2+} -vermittelte allosterische Hemmung von NR1/NR2-Rezeptoren physiologisch bedeutsam zu sein. Zusätzlich zeigen alle NR1/NR2-Subtypen eine niedrigaffine, spannungsabhängige Zn^{2+} -Hemmung, die durch konservierte Aminosäurereste in der Ionenkanalpore bestimmt wird (Abb. 3).

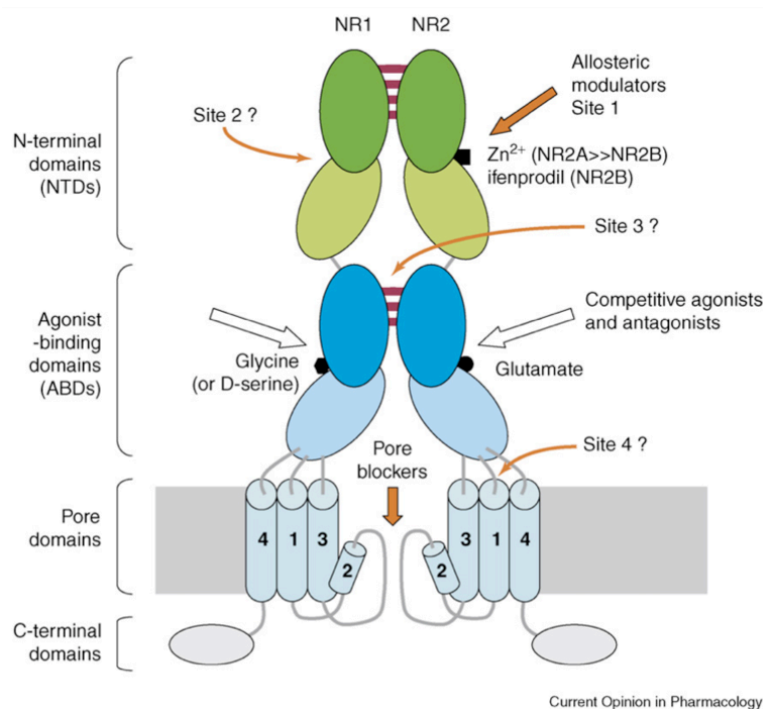


Abb. 3. Schematische Darstellung der Bindungsstellen von Liganden an NMDA-Rezeptoren. Für eine übersichtlichere Darstellung ist nur ein NR1-NR2 Dimer des tetrameren Rezeptorkomplexes gezeigt.

(nach Paoletti und Neyton 2007)

Ein synthetischer Ligand, der die Agonist-induzierten Ströme von NR1/NR2B-Rezeptoren hemmt, ist das Phenylethanolamin Ifenprodil. Studien deuten darauf hin, dass Ifenprodil und Zn^{2+} in ähnlicher Weise wirken. Dieses wird durch Befunde unterstützt, welche nahe legen, dass sich die Ifenprodilbindungsstelle ebenso wie die Zn^{2+} -Bindung in der NTD der NR2B-Untereinheit befindet (Perin-Dureau et al. 2002) (Abb. 3) und die Ifenprodilwirkung auch auf einer Erhöhung der Protonen-vermittelten Inhibition basiert (Mott et al. 1998).

Ein tieferes Verständnis darüber, wie die Ligandenbindung in der NTD mit der Ionenkanalöffnung gekoppelt ist, steht aber bis zum jetzigen Zeitpunkt noch aus. Daher ist es schwierig, die zugrunde liegenden Wirkmechanismen von Modulatoren, wie z.B. Zn^{2+} oder Ifenprodil, zu erklären.

2.4.5 Strukturelle Aspekte der NMDA-Rezeptor-Aktivierung

Die gegenwärtigen Vorstellungen über die ablaufenden Änderungen bei der Aktivierung und Desensitisierung von iGluRs basieren im Wesentlichen auf Kristallisationsstudien mit den LBDs von AMPA- und NMDA-Rezeptoruntereinheiten (Armstrong et al. 1998, Furukawa und Gouaux 2003, Übersicht in Mayer 2006). Diese zeigen, dass die LBD eine aus zwei Subdomänen (D1 und D2; Abb. 4) bestehende zweiblättrige Struktur darstellt, welche sich nach Bindung des Agonisten muschelartig schließt (Abb. 4, Mitte). Grundlegend für den Aktivierungsmechanismus ist dabei die Dimerisierung zweier benachbarter LBDs, die über ihre D1 Regionen ähnlich einer „Rücken-an-Rücken“ Anordnung fest miteinander verbunden sind (Furukawa et al. 2005). Durch das Schließen der Bindungstasche bewegen sich die D2 Subdomänen voneinander weg (Abb. 4, rechts). Die daraus resultierenden Kräfte werden in die TMD weitergeleitet und bewirken das Öffnen des Ionenkanals (Banke und Traynelis 2003). Die damit verbundenen Konformationsänderungen führen gleichzeitig zum Abschwächen der Wechselwirkungen zwischen den D1 Regionen benachbarter LBDs, so dass die dimere Struktur der LBD

auseinander bricht und der Ionenkanal wieder schließt. Auf diesem Vorgang beruht der Mechanismus der Desensibilisierung (Sun et al. 2002), d.h. das Schließen des Rezeptors in Gegenwart gebundener Agonisten. Obwohl für die NTD noch keine kristallographischen Daten existieren, wird eine der LBD ähnliche Struktur auch für diese Rezeptorregion vermutet (siehe auch Abb. 3, grüner Teil).

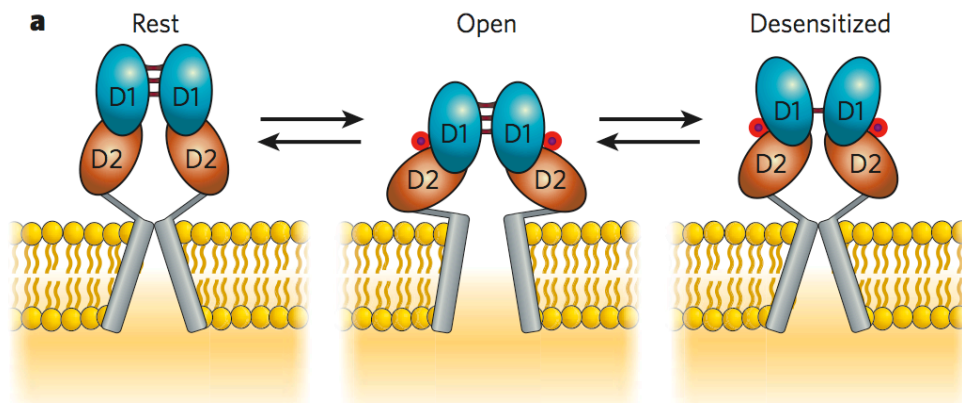


Abb. 4. Mechanistisches Modell der Aktivierung und Desensibilisierung von iGluRs. Links, ungebundener, geschlossener Rezeptor; Mitte, offener, Liganden-gebundener Rezeptor; Rechts, desensibilisierter Rezeptor.

(aus Mayer 2006)

2.5 Physiologische und pathophysiologische Rolle von NMDA-Rezeptoren

Wie bereits in Kapitel 2.4.2 beschrieben, stellt der NMDA-Rezeptor einen Koinzidenzdetektor dar, d.h. die Aktivierung des Ionenkanals durch Neurotransmitter ist direkt mit dem Erregungszustand der Nervenzelle gekoppelt. Eine physiologische Aktivierung des Rezeptors ist für das Aufrechterhalten der erregenden Signalübertragung zwischen Nervenzellen absolut essentiell. Sehr wichtig dabei ist, dass der Rezeptorstrom zu einem großen Teil von Ca^{2+} getragen wird, was zur Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen *Second Messenger* Kaskaden in der postsynaptischen Zelle führt. Durch die Weiterleitung des Signals in den Zellkern werden Gene aktiviert, deren Proteinprodukte sowohl für das Überleben der Nervenzelle wichtig sind, aber auch maßgeblich die Effizienz der synaptischen Signalübertragung

beeinflussen. Dieses Phänomen der langzeitlichen synaptischen Plastizität (Langzeitpotenzierung) stellt wahrscheinlich die molekulare Grundlage der Gedächtnisbildung und des Lernens dar (Bliss und Lomo 1973, Übersicht in Malenka und Nicoll 1999).

Aufgrund der physiologischen Bedeutung von NMDA-Rezeptoren ist es nicht überraschend, dass ein Ungleichgewicht von erregenden Neurotransmittern wie Glutamat zu Erkrankungen des zentralen Nervensystems führen kann (Übersicht in Kemp und McKernan 2002). Eine stark erhöhte Glutamatkonzentration ist dabei für Nervenzellen hochgiftig und führt zum Zelltod. Da Glutamat der wichtigste erregende Neurotransmitter ist und daher die Dichte an Glutamatrezeptoren im Gehirn sehr hoch ist, sind die meisten Nervenzellen von dem als Glutamat-Exzitotoxizität (Lee et al. 1999) bezeichneten Vorgang betroffen. Maßgeblich für das Absterben der Neurone ist ein massiver Einstrom von Ca^{2+} ins Zellinnere, der hauptsächlich durch Überaktivierung von NMDA-Rezeptoren erfolgt. Infolgedessen wären NMDA-Rezeptor-Antagonisten prinzipiell für jede neurologische Erkrankung interessant, die mit einem Absterben von Nervenzellen aufgrund Glutamat-induzierter Exzitotoxizität einhergeht. Dazu zählen unter anderem die zerebrale Ischämie nach einem Schlaganfall oder Hirntrauma, und neurodegenerative Krankheiten wie z.B. Morbus Parkinson und Morbus Huntington. Eine Überaktivierung der erregenden, glutamatergen Signalübertragung wird auch bei Epilepsie und neuropathischem Schmerz beobachtet, so dass NMDA-Rezeptor-Antagonisten auch bei diesen Erkrankungen grundsätzlich hohes therapeutisches Potential besitzen. Als großes Hindernis für die therapeutische Nutzung erwiesen sich jedoch inakzeptable Nebenwirkungen wie Halluzinationen, Schizophrenie-artige Symptome oder schwere motorische und kognitive Störungen in verschiedenen klinischen Studien. Die getesteten Verbindungen waren allerdings kaum selektiv für verschiedene Rezeptorsubtypen und dürften demzufolge die Funktion aller NMDA-Rezeptoren beeinflusst haben.

Zahlreichen Untersuchungen zufolge ist eine Unterfunktion von NMDA-Rezeptoren ein wesentliches Merkmal von Erkrankungen, die kognitive Leistungen und Wahrnehmungsprozesse beeinflussen (Übersicht in Lindsley et al. 2006). Das prominenteste Beispiel hierfür ist die Schizophrenie. Es wurde berichtet, dass Kanalblocker des NMDA-Rezeptors, wie z.B. Phencyclidin oder Ketamin, die Gedächtnisbildung stark beeinträchtigen und Schizophrenie-artige Symptome beim Menschen hervorrufen (Übersicht in Tsai und Coyle 2002). Infolgedessen sollte eine erhöhte NMDA-Rezeptor-Aktivität für die Behandlung solcher Erkrankungen förderlich sein. Potentielle Strategien hierzu werden derzeit in klinischen Studien geprüft und beruhen u.a. auf einer Verlangsamung der Rezeptordesensibilisierung oder einem Antagonismus der Zn^{2+} -vermittelten allosterischen Hemmung von NMDA-Rezeptoren.

Aufgrund der zentralen Rolle von NMDA-Rezeptoren für viele Hirnfunktionen erscheinen generell Substanzen vielversprechend, die ein partiell agonistisches bzw. antagonistisches sowie Subtyp-spezifisches Wirkprofil besitzen.

2.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle der NTDs, speziell der NR1-NTD, auf die Assemblierung, Funktion und allosterische Modulation von rekombinanten NR1/NR2A- und NR1/NR2B-NMDA-Rezeptoren anhand biochemischer und elektrophysiologischer Methoden zu untersuchen. Dies sollte durch die Expression von N-terminal deletierten Untereinheiten erfolgen. Parallel dazu wurde eine NR1-Untereinheit generiert, dessen NTD aus funktionellen Rezeptoren enzymatisch abgetrennt werden konnte.

Außerdem sollten die Wechselwirkungen der NR2-NTDs im tetrameren Rezeptorkomplex durch mutierte Untereinheiten untersucht werden, deren NTDs untereinander ausgetauscht wurden, d.h. eine NR2A-Untereinheit, welche die NTD der NR2B-Untereinheit enthält und umgekehrt.

Ein weiteres Ziel war die funktionelle Charakterisierung von NR1/NR3-Rezeptoren, die allein durch Glyzin aktivierbar sind. Dabei sollte untersucht werden, worauf die geringe Effizienz dieser Rezeptoren nach Applikation des Agonisten zurückzuführen ist. Speziell sollte der Einfluss der Glyzin-bindenden NR1- und NR3-LBDs auf die Rezeptorfunktion näher analysiert werden sowie Möglichkeiten der Rezeptormodulation getestet werden.

3. Ergebnisse - Zusammenfassungen der Publikationen, die im Rahmen der Dissertation entstanden sind

3.1 Publikation 1

Madry, C., Mesic, I., Betz, H. and Laube, B. (2007). The N-Terminal Domains of both NR1 and NR2 Subunits Determine Allosteric Zn^{2+} Inhibition and Glycine Affinity of N-Methyl-D-aspartate Receptors. *Molecular Pharmacology* **72**, 1535-1544

Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss der N-terminalen Domänen (NTD), speziell der NR1-NTD, auf die Assemblierung und Funktion von NR1/NR2-NMDA Rezeptoren zu untersuchen. Da es bisher noch nicht gelungen war, funktionelle Rezeptoren mit N-terminal entfernter NR1-Untereinheit zu analysieren, wurde zunächst ein NR1-Konstrukt hergestellt, welches am Übergang zwischen NTD und Liganden-Bindungsdomäne eine zusätzlich eingefügte Thrombin-Erkennungssequenz (thrombin cleavage site: TCS) enthielt (EGFP-NR1^{TCS}, Publikation Fig. 1A). Dadurch wurde das proteolytische Abschneiden der ca. 400 Aminosäuren langen NR1-NTD von funktionellen und an der Zelloberfläche befindlichen Rezeptoren ermöglicht, ohne jedoch deren korrekte Assemblierung durch ein initiales Fehlen dieser Domäne zu stören. Mit Hilfe eines N-terminal angehängten EGFP (verstärkt grün-fluoreszierendes Protein) konnte das enzymatisch abgetrennte N-terminale NR1 Fragment sichtbar gemacht und immunologisch nachgewiesen werden.

Die Zugänglichkeit des Thrombins an seine Erkennungssequenz wurde an EGFP-NR1^{TCS}/NR2A-Rezeptoren exprimierenden HEK-293 Zellen getestet. Nach Einwirkung der Protease und darauf folgender Western-Blot Analyse der Membranfraktion wurden zusätzlich zur vollständigen NR1-Untereinheit zwei NR1 Spaltprodukte detektiert, welche aufgrund ihrer Größe dem abgetrennten N-Terminus und dem verbleibenden Restprotein der NR1-Untereinheit

zugeordnet werden konnten (Publikation Fig. 1B). Dieses Ergebnis beweist, dass die NTD der NR1-Untereinheit effektiv mittels Proteolyse abgetrennt werden kann.

Die funktionelle, elektrophysiologische Analyse EGFP-NR1^{TCS}/NR2A-Rezeptoren erfolgte an *Xenopus*-Oozyten unter Anwendung der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme. Die maximalen Glyzin- und Glutamat-induzierten Ströme blieben nach Thrombinbehandlung der Zellen unverändert, was nicht auf einen grundlegenden Einfluss der NR1-NTD auf die Rezeptorfunktion hindeutet. Es wurde jedoch eine drastische Abnahme der Zn²⁺-vermittelten allosterischen Hemmung sowohl für NR2A-, wie auch NR2B-enhaltende Rezeptoren festgestellt (Publikation Fig. 2A, B).

Um die Bedeutung der NR1-NTD auf die Rezeptorassemblierung zu untersuchen, wurde eine NR1-Untereinheit synthetisiert, deren gesamte NTD entfernt wurde (NR1^{ΔNTD}, Publikation Fig. 1A). Dieses Konstrukt sowie die Wildtyp-Untereinheit wurden zusammen mit NR2A-His-Untereinheiten in Oozyten exprimiert, nach metabolischer Markierung über die Histidin-Markierung an der NR2A-Untereinheit aufgereinigt und die resultierenden Proteinkomplexe mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die autoradiographische Auswertung der Proteinbanden ergab, dass sowohl die Wildtyp-NR1- als auch die NR1^{ΔNTD}-Untereinheit in einem festen 1:1 Verhältnis mit der NR2A-His-Untereinheit assemblieren und beide NR1 Polypeptide zu vergleichbaren Mengen an Rezeptoren führen (Abb. 5A; s.u.). Funktionell betrachtet waren die maximal induzierbaren Ströme der teilweise oder vollständig N-terminal verkürzten NR1/NR2B-Rezeptoren mit denen des Wildtyps identisch (Abb. 5B; s.u.). Unterschiede waren jedoch im Ausmaß der Rezeptordesensibilisierung zu sehen (Abb. 5C, D; s.u.). Folglich scheinen die NTDs der NR1- und NR2-Untereinheiten nicht an der Bildung funktioneller Rezeptoren sowie deren Einbau in die Zellmembran beteiligt zu sein.

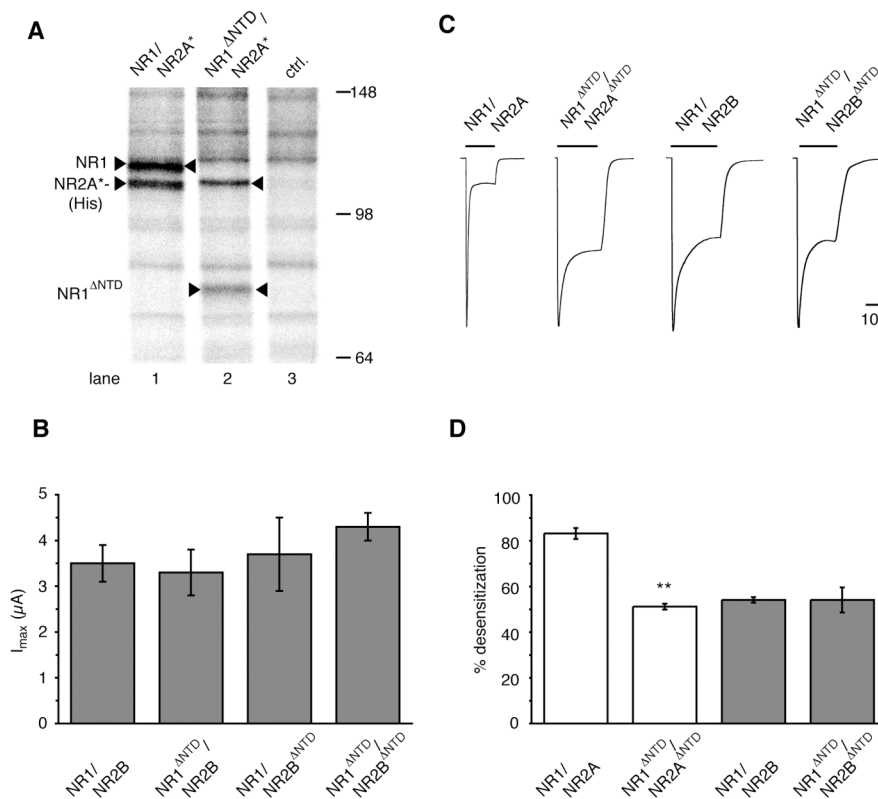


Abb. 5. Assemblierung und funktionelle Eigenschaften von NTD-verkürzten NR1/NR2-NMDA-Rezeptoren. (A) Die NR1^{ΔNTD}-Untereinheit bildet heterooligomere Komplexe mit der NR2A-Untereinheit. Spur A zeigt zwei Banden mit einer jeweiligen molekularen Masse von ca. 116 und 105 kDa, welche die aufgereinigte Wildtyp-NR1- sowie die NR2A-His-Untereinheiten darstellen. Die Koexpression des NR1^{ΔNTD}- mit dem NR2A-His-Konstrukt resultierte ebenso in zwei gemeinsam aufgereinigten Banden von ca. 78 und 105 kDa molekularer Masse, die die NR1^{ΔNTD}- und die NR2A-His-Untereinheit darstellen (Spur B). Spur C, Kontrollaufreinigung aus nicht injizierten Oozyten. (B) Die quantitative Analyse der mittleren maximalen Ströme von NTD-verkürzten NR1/NR2B-Rezeptorkombinationen ergab keine signifikanten Unterschiede verglichen zum Wildtyp. (C) Beispielströme von NR1/NR2A-Rezeptorkombinationen, die das Ausmaß der Desensitisierung verdeutlichen. (D) Relative Verhältnisse von Maximalstrom zum Gleichgewichtsstrom der unter C dargestellten Rezeptoren. (** bedeutet eine Signifikanz von $p < 0.001$ unter Anwendung eines ungepaarten Student t-Tests)

Die systematische funktionelle Analyse der N-terminal verkürzten NR1/NR2A- bzw. NR1/NR2B-Rezeptorkombinationen verdeutlichte erneut, ähnlich wie bei den proteolytisch verkürzten NR1^{TCS}/NR2A-Rezeptoren, den Einfluss der NTDs auf die Modulation der Rezeptorfunktion. Sowohl die allosterische Zn²⁺-Hemmung von NR1/NR2A- und NR1/NR2B- als auch die durch das Phenylethanolamin Ifenprodil vermittelte Inhibition von NR1/NR2B-Rezeptoren

waren durch teilweisen bzw. gänzlichen Verlust beider NTDs vollständig aufgehoben (Abb. 6A-C; s.u.). Die erst bei stark erhöhten Zn^{2+} - und Ifenprodil Konzentrationen einsetzende Hemmung des Agonist-aktivierten Stromes zeigte sowohl eine spannungsabhängige als auch spannungsunabhängige Komponente (Publikation Fig. 5 A-D).

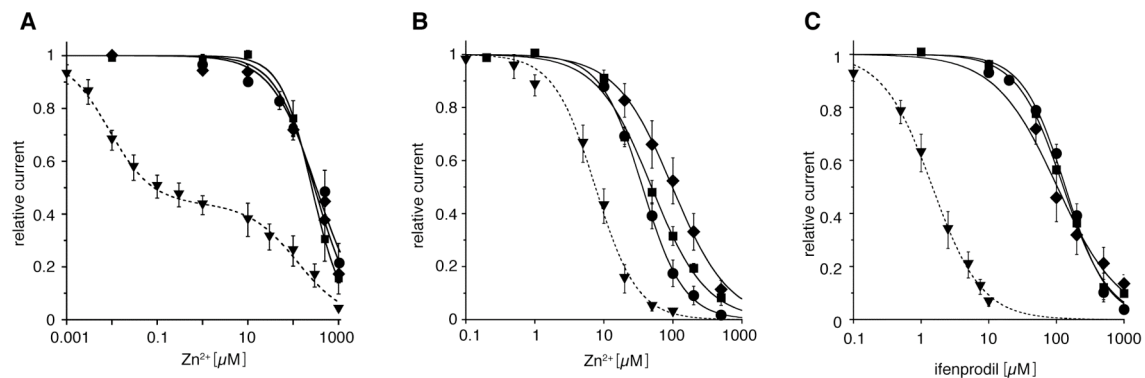


Abb. 6. Allosterische Zn^{2+} - und Ifenprodil-vermittelte Hemmung von NR1/NR2-NMDA-Rezeptoren deren NTDs entfernt wurden. Inhibition der Agonist-induzierten Ströme durch Zn^{2+} von Wildtyp (wt) und NTD-entfernten (**A**) NR1/NR2A- und (**B**) NR1/NR2B-Rezeptoren. Die Konzentration der Agonisten Glyzin und Glutamat war jeweils $100 \mu\text{M}$. (**A**) Zn^{2+} Hemmung von wt NR1/NR2A- (\blacktriangledown), NR1 $^{\Delta\text{NTD}}$ /NR2A- (\blacksquare), NR1/NR2A $^{\Delta\text{NTD}}$ - (\bullet) und NR1 $^{\Delta\text{NTD}}$ /NR2A $^{\Delta\text{NTD}}$ - (\blacklozenge) Rezeptoren. Man beachte die biphasische Hemmung des wt Rezeptors mit einer hochaffinen Komponente, welche zu 60% der Gesamthemmung beiträgt, sowie einer niedrig affinen Komponente, die die verbleibenden 40% der Hemmung beisteuert. Bei allen mutierten Rezeptorkombinationen war die hoch affine Hemmung aufgehoben, während die niedrigaffine unbeeinflusst blieb. (**B**) Zn^{2+} Hemmung von wt NR1/NR2B- (\blacktriangledown), NR1 $^{\Delta\text{NTD}}$ /NR2B- (\blacksquare), NR1/NR2B $^{\Delta\text{NTD}}$ - (\bullet) und NR1 $^{\Delta\text{NTD}}$ /NR2B $^{\Delta\text{NTD}}$ - (\blacklozenge) Rezeptoren. (**C**) Ifenprodil-vermittelte Hemmung der unter (B) beschriebenen NR1/NR2B-Rezeptorkombinationen. Die in NR1 $^{\Delta\text{NTD}}$ /NR2B-, NR1/NR2B $^{\Delta\text{NTD}}$ - und NR1 $^{\Delta\text{NTD}}$ /NR2B $^{\Delta\text{NTD}}$ -Rezeptoren verbleibende Hemmung liegt für Zn^{2+} und Ifenprodil in einem ähnlichen Konzentrationsbereich.

Neben den Effekten auf die allosterische Hemmung wiesen NTD-verkürzte NR1/NR2B-Rezeptorkombinationen auch eine signifikant verringerte apparente Glyzinaffinität auf, während sich die Affinität von Glutamat nicht änderte (Publikation Tabelle 2). Für NR1/NR2A-Kombinationen wurden keine Unterschiede in der Affinität beider Agonisten festgestellt (Publikation Tabelle 1). Dieses Ergebnis bedeutet, dass die NTDs der NR1- als auch jene der NR2B-Untereinheiten die apparente Glyzinaffinität beeinflussen. Um diese Schlussfolgerung weiter zu erhärten, wurden zwei NR2-Chimären-Konstrukte in

die Analyse einbezogen, bei denen die NTD der NR2A-Untereinheit mit jener der NR2B-Untereinheit (NR1/NR2A^{NTD2B}) ausgetauscht wurde und umgekehrt (NR1/NR2B^{NTD2A}). Es stellte sich heraus, dass NR1/NR2A^{NTD2B}-Rezeptoren dieselbe Glyzinaffinität besaßen wie Wildtyp-NR1/NR2B-Rezeptoren, welche etwa 10x höher als beim NR1/NR2A-Wildtyp ist (Publikation Fig. 6A, B). Ebenso war die Glyzinaffinität von NR1/NR2B^{NTD2A}-Rezeptoren derer vom NR1/NR2A-Typ identisch (Publikation Fig. 6A, B). Dieses Ergebnis bedeutet, dass die NTDs der NR2A- und NR2B-Untereinheiten nicht nur die allosterische Inhibition vermitteln, sondern auch an der Regulation der Glyzinaffinität verschiedener NMDA-Rezeptor-Subtypen beteiligt sind.

Zusammenfassend wurde in dieser Studie gezeigt, dass die NTDs von NR1- und NR2A- bzw. NR2B-NMDA-Rezeptoruntereinheiten nicht für die Rezeptorbildung und deren Funktion von Bedeutung sind, sondern die hochaffine allosterische Zn²⁺- und Ifenprodil-Inhibition bestimmen. Ausserdem stellen die NR2-NTDs eine entscheidende strukturelle Determinante für die unterschiedliche Glyzinaffinität von NR1/NR2A- und NR1/NR2B-Rezeptoren dar.

Persönlicher Beitrag zu diesem Projekt:

Die Klonierung der verwendeten NR1-Konstrukte (EGFP-NR1^{TCS}; NR1^{ΔNTD}), der biochemische Thrombin-Abspaltungsassay sowie die elektrophysiologischen Analysen wurden selbst durchgeführt.

Die biochemischen Versuche der Proteinmarkierung und -Aufreinigung wurden von Frau I. Mesic durchgeführt.

3.2 Publikation 2

Schüler, T., Mesic, I., **Madry, C.**, Bartholomäus, I., Laube, B. (2007). Formation of NR1/NR2 and NR1/NR3 Heterodimers Constitutes the Initial Step in N-Methyl-D-aspartate Receptor Assembly. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 37-46

Zusammenfassung

In dieser Studie wurde der Ablauf der Oligomerisierung der NMDA-Rezeptor-untereinheiten NR1, NR2 und NR3 als initialer Schritt der Rezeptorsynthese untersucht. Bisherige Studien haben eine initiale Dimerisierung der NR1-Untereinheiten favorisiert, gefolgt von der sukzessiven Anlagerung der NR2- und/oder NR3-Untereinheiten.

Um die assoziierten Untereinheiten nachzuweisen, wurden fluoreszierende Protein-Tags an die NR1-, NR2- und NR3-Untereinheiten angehängt. Nach rekombinanter Expression wurde die räumliche Nähe der in den resultierenden Rezeptorkomplexen eingebauten Untereinheiten mittels Fluoreszenz-Energie-Transfer (FRET) analysiert. Diese Methode wurde mit der nativen Gelelektrophorese kombiniert, für die die entsprechenden Untereinheiten metabolisch markiert und affinitätschromatographisch aufreinhalt wurden. Beide Verfahren bestätigten die Fähigkeit der NR1-Untereinheit, Homodimere zu bilden, welche auf der Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den aminoterminalen Rezeptorregionen beruhen. Es wurde jedoch auch gefunden, dass die NR2- und NR3-Untereinheiten nur in Gegenwart der NR1-Untereinheit miteinander assoziieren können.

Um zu prüfen, ob die NR1-NR1 Homodimerisierung auch von funktioneller Bedeutung ist, wurde ein NR1-Konstrukt generiert, dessen gesamte NTD entfernt wurde (NR1^{ΔNTD}). Die Bildung von NR1 Dimeren konnte nach rekombinanter Expression des NR1^{ΔNTD}-Konstruktes nicht mehr nachgewiesen werden. Dennoch resultierte die Ko-expression der NR1^{ΔNTD}- mit der NR3A-Untereinheit in funktionellen NR1^{NTD}/NR3A-Rezeptoren, welche das gleiche

Stöchiometrie-Verhältnis der NR1^{NTD}- und NR3A-Untereinheiten von 1:1 aufwiesen wie im entsprechenden NR1/NR3A-Wildtyp-Rezeptor (siehe nachfolgende Abb. 7).

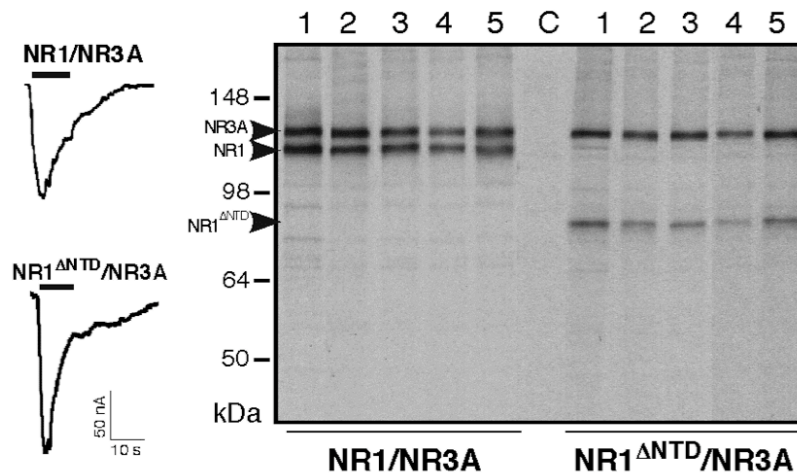


Abb. 7. Vergleich der Glyzin-induzierten Ströme und Proteinexpression von NR/NR3A- und NR1^{ΔNTD}/NR3A-Rezeptoren.

Links, Das N-terminal verkürzte NR1^{ΔNTD}-Konstrukt zeigte keinen Unterschied im maximal Glyzin-induzierten Rezeptorstrom verglichen zum wt NR1/NR3A-Rezeptor. **Rechts,** Ähnliche Proteinmengen wurden von wt- und NR1^{ΔNTD}/NR3A-Rezeptoren aus metabolisch markierten Oozyten bis zu 5 Tage nach cRNA Injektion aufgereinigt und per SDS-PAGE visualisiert.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Homodimerisierung der NR1-Untereinheit keine Rolle für die Bildung funktioneller Rezeptoren spielt. Der entscheidende Schritt der Rezeptorassembly ist folglich die Bildung von NR1-NR2 oder NR1-NR3 Heterodimeren, gefolgt von der Zusammenlagerung zweier Heterodimere zum tetrameren NMDA-Rezeptorkomplex (Abb. 8, s.u.).

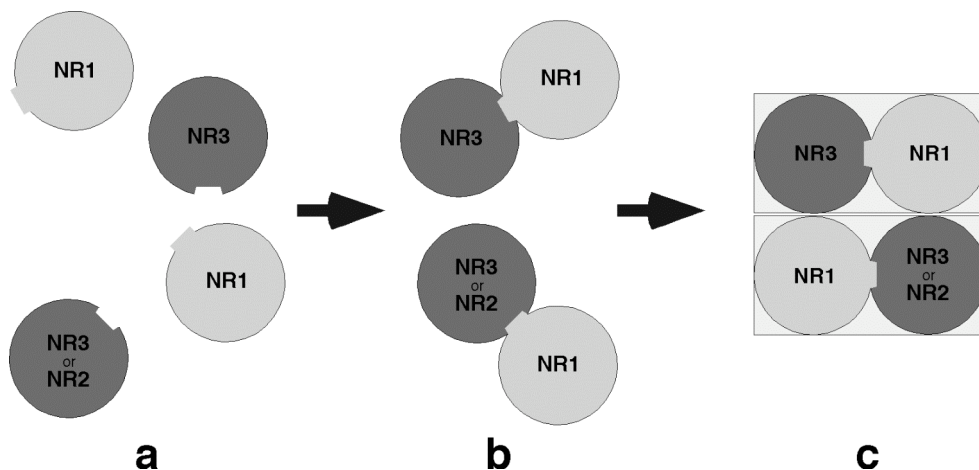


Abb. 8. Schematisches Modell der Assemblierung zweier Heterodimere zum tetrameren NMDA-Rezeptor. Die zwei grundlegenden Schritte sind **(a)** die Heterodimerisierung einer NR1- mit der NR2- oder NR3-Untereinheit, gefolgt von **(b)** der Dimerisierung zweier NR1-NR2- oder NR1-NR3-Komplexe zum tetrameren Rezeptor bestehend aus NR1/NR2- oder NR1/NR2/NR3-Untereinheiten. **(c)** Wir nehmen an, dass sich die intermediären Heterodimere (in b) symmetrisch zum Tetramer zusammenlagern.

Persönlicher Beitrag zu diesem Projekt:

Die Generierung des NR1^{ΔNTD}-Konstruktes sowie die elektrophysiologische Analyse der Wildtyp NR1/NR3A- und NR1^{ΔNTD}/NR3A-Rezeptoren wurden selbst durchgeführt.

Die FRET-Experimente wurden von Herrn Dr. T. Schüler, die biochemischen Versuche der Proteinmarkierung und -Aufreinigung von Frau I. Mesic durchgeführt.

3.3 Publikation 3

Madry, C., Mesic, I., Bartholomäus, I., Nicke, A., Betz, H. and Laube, B. (2007). Principal role of NR3 subunits in NR1/NR3 excitatory glycine receptor function. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **354**, 102-108

Zusammenfassung

Die bisher untersuchten NMDA-Rezeptoren des so genannten „konventionellen“ Typs bestanden aus Kombinationen der glyzinbindenden NR1- und Glutamat-bindenden NR2-Untereinheiten. Treten anstelle der NR2-Untereinheiten die Glyzin-bindenden NR3A- bzw. NR3B-Isoformen, entstehen heteromere, exzitatorische NR1/NR3-Rezeptoren. Diese werden ausschließlich durch den hemmenden Neurotransmitter Glyzin aktiviert und unterscheiden sich grundlegend hinsichtlich ihrer biophysikalischen Eigenschaften gegenüber konventionellen NR1/NR2-Rezeptoren (siehe Einleitung).

Ziel dieser Studie war die pharmakologische Charakterisierung der in *Xenopus*-Oozyten exprimierten NR1/NR3-Rezeptoren mittels biochemischer und elektrophysiologischer Analysemethoden. Zunächst wurden die Menge und das Verhältnis der Untereinheiten von membranständigen NR1/NR3A-Rezeptoren und konventionellen NR1/NR2A-Rezeptoren verglichen. Obwohl in beiden Fällen die entsprechenden Rezeptoren das gleiche Verhältnis von NR1:NR2A- bzw. NR1:NR3A-Untereinheiten aufwiesen (2:2) sowie ähnlich effizient synthetisiert und in die Zellmembran eingebaut wurden, lieferten NR1/NR3A-Rezeptoren nur sehr kleine und schnell desensitisierende Maximalströme, die im Vergleich zu den parallel exprimierten NR1/NR2A-Rezeptoren um den Faktor 25 geringer ausfielen (Abb. 9 A-C, s.u.; Publikation Fig. 1 D, F). Auch NR1/NR3B-Rezeptoren produzierten nur sehr kleine Glyzin-aktivierte Maximalströme (Publikation Fig. 1 E, F).

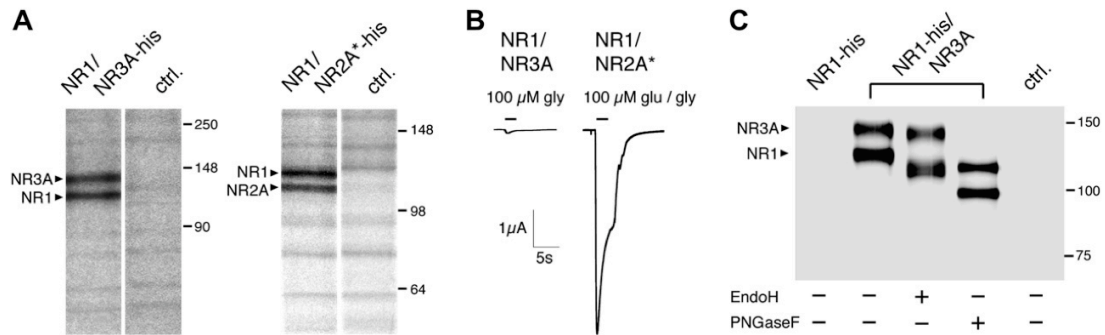


Abb. 9. Vergleich zwischen heterologer Expression und Funktion von NR1/NR3A- und NR1/NR2A-Rezeptoren. **(A)** SDS-PAGE von metabolisch markierten und über Affinitätschromatographie aufgereinigten Rezeptoren aus Oozyten, welche NR1- und NR3A-His Untereinheiten ko-exprimieren (links) bzw. NR1- und NR2A-His-Untereinheiten (rechts). Man beachte die vergleichbaren Proteinmengen aller Untereinheiten. **(B)** NR1/NR3A- (links) und NR1/NR2A- (rechts) exprimierende Oozyten zeigten große Unterschiede in den maximalen Agonist-aktivierten Rezeptorströmen. **(C)** SDS-PAGE von aufgereinigten NR1-His/NR3A-Rezeptoren nach Cy5-Oberflächenproteinmarkierung im Vergleich zur Expression der NR1-His-Untereinheit allein. Für die Analyse des Glykosylierungsstatus der Untereinheiten wurden die Glykosidasen Endo H und PNGase F nach Affinitätsaufreinigung der Rezeptorkomplexe zugegeben. Kennzeichnung unter den jeweiligen Bahnen. (ctrl., Aufreinigung aus nicht injizierten Oozyten)

Um den Beitrag der für die Rezeptoraktivierung verantwortlichen NR1- und NR3-Ligandenbindungsdomänen (LBDs) zu untersuchen, wurden die Effekte von Antagonisten der jeweiligen Bindungstaschen auf die Glyzin-induzierten Ströme getestet. Die durch jeweils 20 μ M Glyzin aktivierten NR1/NR3A- bzw. NR1/NR3B-Rezeptoren wurden in Gegenwart von 5 μ M 6-Cyano-7-Nitro-Chinoxalin-2,3-dion (CNQX), dem derzeit selektivsten kompetitiven NR3A-Antagonisten, zu über 80% gehemmt (Abb. 10 A, E; s.u.). Im Gegensatz dazu führte der hochselektive Glyzinbindungsantagonist an der NR1-Untereinheit, 3-(4,6-Dichloro-2-Carboxyindol-3-yl)-propionsäure (MDL-29951, MDL; Baron et al., 1992), zu einer drastischen, ca. 25-fachen Potenzierung des maximalen NR1/NR3A-vermittelten Rezeptorstromes (Abb. 10 B, D; s.u.). Die für die halbmaximale Potenzierung erforderliche MDL Konzentration lag bei 21 nM (Abb. 10 C; s.u.). Qualitativ ähnlich wurden auch die maximalen Ströme von NR1/NR3B-Rezeptoren durch den NR1-Antagonisten MDL erhöht (Abb. 10 F, G, s.u.). Das bedeutet, dass sich NR1/NR3-Rezeptoren durch das Binden von

Glyzin an die NR1-LBD selbst inhibieren („Auto-Inhibition“), was sich in den vergleichsweise kleinen und rasch desensitisierenden Maximalströmen manifestiert (siehe Publikation Fig. 1 B). Allerdings bewirkte die Gegenwart des kompetitiven NR1-Antagonisten MDL eine signifikante Abnahme der apparenten Glyzinaffinität.

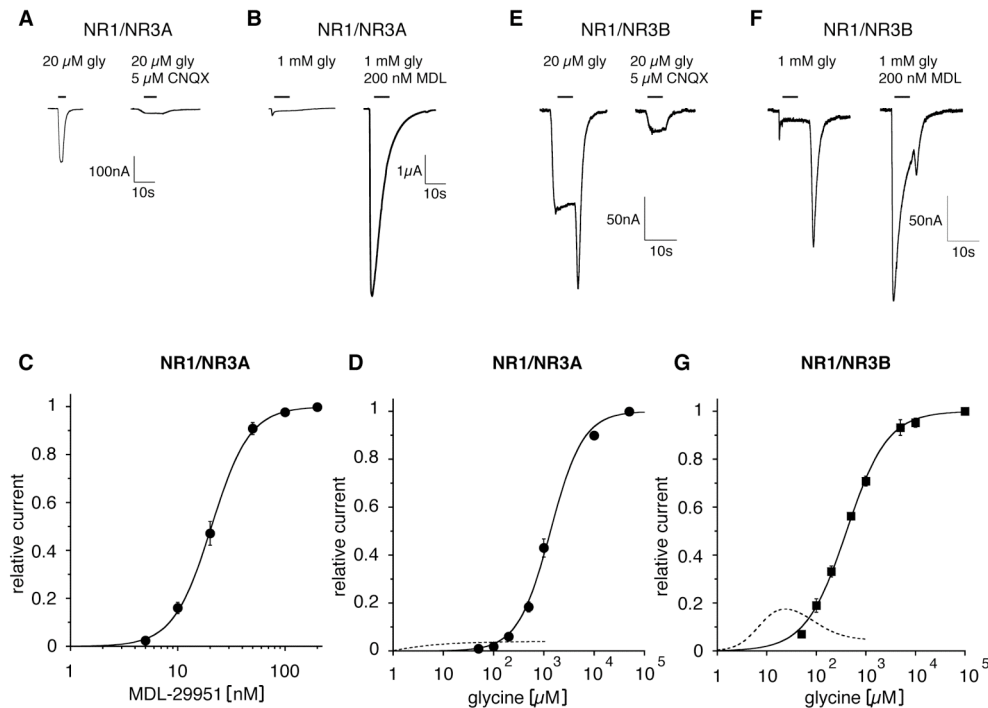


Abb. 10. Effekte von Glyzinantagonisten auf NR1/NR3-Rezeptorströme. Glyzin-aktivierte Ströme von NR1/NR3A-Rezeptoren wurden **(A)** durch CNQX ca. 90% gehemmt, und **(B)** ca. 25-fach durch MDL potenziert. **(C)** Dosis-Abhängigkeit der MDL-Potenzierung von NR1/NR3A-Rezeptoren in Gegenwart von 500 μ M Glyzin (EC_{50} : 21 ± 1.7 nM, $n=8$). **(D)** Glyzin Dosis-Wirkungskurve in Gegenwart von 200 nM MDL (volle Linie). Die ohne MDL erhaltenen Werte (gestrichelte Linie) sind im relativen Verhältnis verglichen zu denen mit MDL dargestellt. **(E)** Glyzinströme von NR1/NR3B-Rezeptoren wurden durch 5 μ M CNQX ca. 80% gehemmt, und **(F)** ca. 6-fach erhöht durch Zugabe von MDL. **(G)** Glyzin Dosis-Wirkungskurve von NR1/NR3B-Rezeptoren in Gegenwart (volle Linie) und Abwesenheit (gestrichelte Linie) von 200 nM MDL. Fehlerbalken in C, D, G stellen den Standardfehler dar.

Die differenziellen Effekte der kompetitiven NR1- bzw. NR3-Antagonisten konnten auch an Rezeptoren erzielt werden, deren Glyzinbindung durch gezielte Mutationen in den jeweiligen NR1- bzw. NR3-Bindungstaschen stark beeinträchtigt bzw. verhindert wurde (Publikation Fig. 3). Somit ist sowohl mittels pharmakologischer als auch genetischer Beeinflussung die bidirektionale Wirkung der NR1- und NR3-LBDs auf die NR1/NR3-Rezeptorfunktion gezeigt worden.

Zusammenfassend bedeutet dieses Ergebnis, dass Glyzin durch das Binden an die NR1-LBD den Rezeptor inhibiert, während die Glyzinwirkung an der NR3-LBD Voraussetzung für die Aktivierung von NR1/NR3-Rezeptoren ist. Die Ergebnisse belegen somit den unterschiedlichen Einfluss der hochaffinen NR3- und der niedrigaffinen NR1-Glyzinbindungsstellen auf die Funktion dieser exzitatorischen Glyzinrezeptoren.

Persönlicher Beitrag zu diesem Projekt:

Sämtliche elektrophysiologischen Analysen sowie die Klonierung der verwendeten Konstrukte wurden selbst durchgeführt.

Die metabolische Markierung und biochemische Aufarbeitung der Rezeptorkomplexe hat Frau I. Mesic beigesteuert. Die Oberflächenproteinmarkierung durch Fluoreszenzfarbstoffe hat Herr I. Bartholomäus durchgeführt.

3.4 Publikation 4

Madry, C., Betz, H., Geiger, J.R.P. and Laube, B. (2008). Supralinear potentiation of NR1/NR3A excitatory glycine receptors by Zn^{2+} and NR1 antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 12563-12568

Zusammenfassung

Die ausschließlich durch Glyzin aktivierten NR1/NR3A-Rezeptoren generieren nur sehr kleine und schnell desensitisierende Ströme. Trotzdem geschieht die Synthese von NR1/NR3A-Rezeptoren sowie deren Einbau in die Zellmembran ähnlich effizient wie bei solchen des konventionellen NR1/NR2-Typs, die nach Zugabe des Agonisten Glutamat und Ko-Agonisten Glyzin jedoch wesentlich größere Stromantworten liefern. Ein bedeutender endogen vorkommender Modulator konventioneller NMDA-Rezeptoren ist das zweiwertige Kation Zink (Zn^{2+}), welches konventionelle Rezeptoren des NR1/NR2A- und NR1/NR2B-Typs im submikromolaren bis mikromolaren Konzentrationsbereich allosterisch hemmt.

In der vorliegenden Studie sollte daher untersucht werden, ob Zn^{2+} auch die Glyzin-aktivierten Ströme von NR1/NR3A-Rezeptoren beeinflusst. Dabei wurde gefunden, dass mikromolare Zn^{2+} -Konzentrationen die Glyzin-induzierten Ströme der rekombinant in *Xenopus*-Oozyten exprimierten Rezeptoren stark erhöhen. Die maximale Potenzierung (etwa 10-fach) lag bei $50 \mu M Zn^{2+}$, gefolgt von einer leichten Abschwächung dieses Effektes bei Konzentrationen $> 100 \mu M Zn^{2+}$ (Fig. 1 A; s.u.). Eine weitere Erhöhung der Zn^{2+} -Konzentration führte zu einer Aktivierung von NR1/NR3A-Rezeptoren auch in der Abwesenheit von Glyzin. Obwohl die zur halbmaximalen Stromantwort erforderliche Zn^{2+} Konzentration > 25 -fach größer als die von Glyzin war ($EC_{50} Zn^{2+}$: $178 \mu M$ vs. EC_{50} Glyzin: $6.5 \mu M$), ergaben sich bei den maximal erreichbaren Zn^{2+} - bzw. Glyzin-induzierten Strömen (I_{max}) keine Unterschiede (I_{max} ca. $0.2 \mu A$ für Zn^{2+} und Glyzin; Abb. 11B; s.u.). Zn^{2+} ist damit sowohl ein positiver allosterischer Modulator der Glyzin-induzierten Ströme als auch, bei höheren Konzentrationen, ein voller Agonist an NR1/NR3A-Rezeptoren.

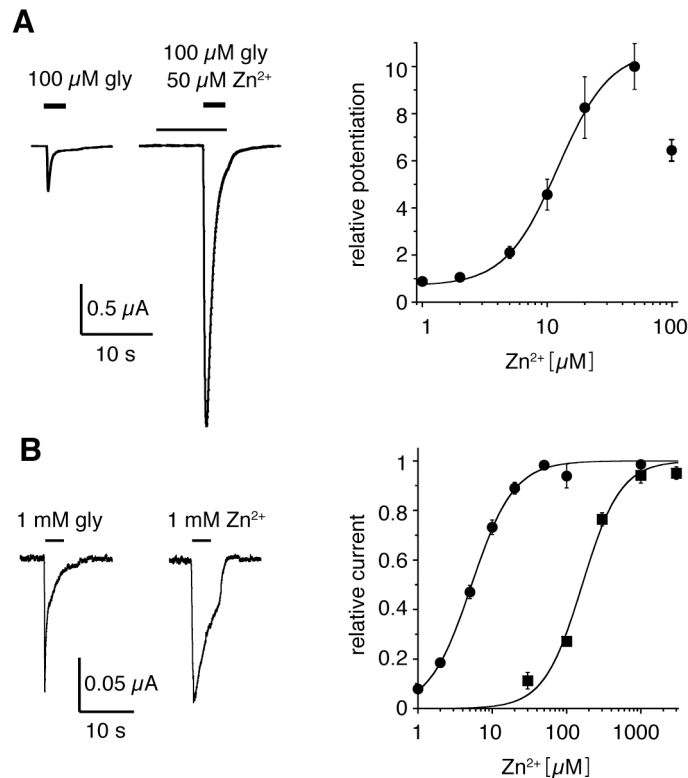


Abb. 11. Zn^{2+} potenziert Glyzin-induzierte Ströme und wirkt als voller Agonist an rekombinanten NR1/NR3A-Rezeptoren. (A) Links: Glyzin-aktivierte NR1/NR3A-Ströme in Gegenwart und Abwesenheit von 50 μ M Zn^{2+} . Rechts: Relative Potenzierung der maximalen Glyzinantwort (100 μ M) durch mikromolare Konzentrationen von Zn^{2+} . (B) Links: Ströme gemessen von der gleichen Zelle erzielten vergleichbare Amplituden bei Zugabe von 1 mM Glyzin und 1 mM Zn^{2+} . Rechts: Dosis-Wirkungs-Analyse ergab eine > 25-fach geringere Zn^{2+} Affinität (Quadrate) verglichen zu der von Glyzin (Kreise). Man beachte, dass 1 mM Konzentrationen sättigende Glyzin- und Zn^{2+} -Antworten hervorrufen.

Es wurde bereits berichtet, dass Antagonisten der Glyzinbindungsstelle der NR1-Untereinheit (z.B. MDL-29951, MDL) die Ströme von NR1/NR3-Rezeptoren stark erhöhen (ca. 25-fach; siehe Publikation 3 dieser Arbeit). Um herauszufinden, ob die MDL- und Zn^{2+} -vermittelten Potenzierungen voneinander unabhängig sind, wurden beide Modulatoren gemeinsam mit einer sättigenden Glyzinkonzentration appliziert. Dies führte zu einer 125-fachen, supralinearen Potenzierung des rein Glyzin-aktivierten Rezeptorstromes, welcher die bloße Addition der beiden isoliert betrachteten potenzierten Ströme durch Zn^{2+} und MDL bei weitem übertraf (Abb. 12 A, B; s.u.). Das bedeutet, dass die der Zn^{2+} - und MDL-Potenzierung zugrunde liegenden Mechanismen nicht identisch sind, sondern dass sie in einer hochkooperativen Art und Weise die

Rezeptoreffizienz erhöhen. Ein weiteres Indiz für diese Schlussfolgerung ist, dass die scheinbaren Glyzinaffinitäten zwar durch MDL, nicht aber durch Zn^{2+} beeinflusst wurden.

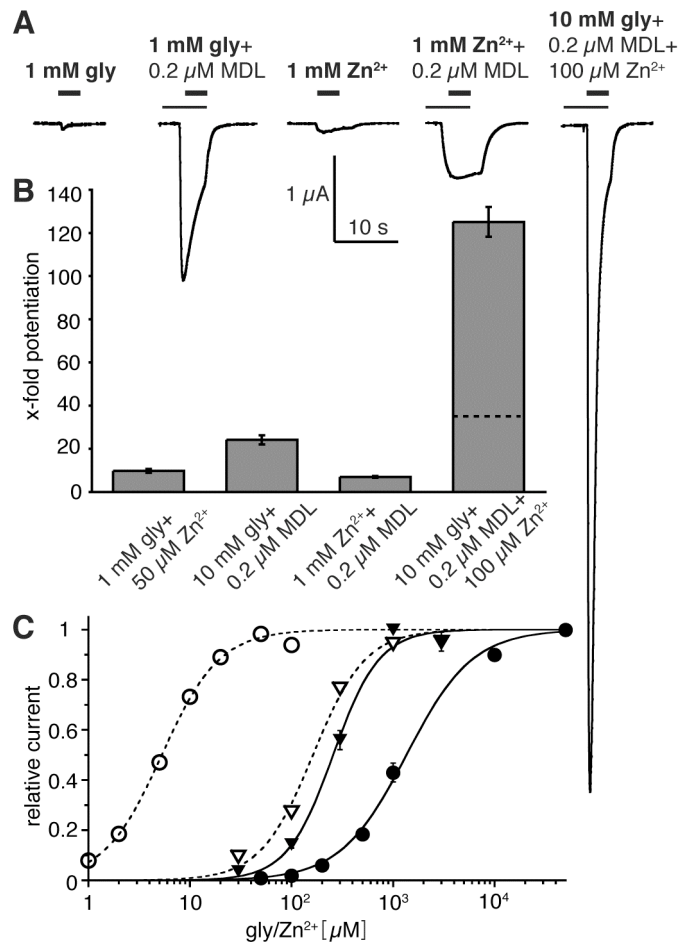


Abb. 12. Supralineare Potenzierung von Glyzin-aktivierten Strömen durch Kombination von Zn^{2+} mit dem NR1 Antagonisten MDL. (A) Einzelströme von NR1/NR3A-Rezeptoren zeigen die Potenzierungen der maximalen Zn^{2+} - und Glyzinantwort (1 mM jeweils) durch 0.2 μM MDL (linke vier Ströme). Die gemeinsame Zugabe von 100 μM Zn^{2+} und 0.2 μM MDL führte zu einer supralinearen Vergrößerung des maximalen Glyzin-induzierten Stroms (ganz rechts). Alle Ströme sind im gleichen Maßstab dargestellt. (B) Quantitative, gepaarte Analyse der maximal induzierbaren Ströme (I_{max}) für die Bedingungen unter (A), dargestellt als x-fache Potenzierung im Vergleich zum (I_{max}) von Glyzin allein. (C) Unterschiedliche Effekte von MDL auf die apparente Glyzin- und Zn^{2+} -Affinitäten. Während MDL die Glyzinaffinität um zwei Größenordnungen erniedrigt (offene Kreise: Glycin allein, volle Kreise: Glycin mit 0.2 μM MDL), wurde die Affinität von Zn^{2+} kaum durch MDL beeinflusst (offene Dreiecke: Zn^{2+} allein, volle Dreiecke: Zn^{2+} mit 0.2 μM MDL).

Die allosterische Zn^{2+} -Hemmung konventioneller NR1/NR2A- und NR1/NR2B-Rezeptoren wird einer Vielzahl von Studien zufolge durch die N-terminale Domäne (NTD) der NR2-Untereinheiten vermittelt. Um herauszufinden, ob die NTDs auch für die beobachtete Zn^{2+} -Aktivierung und -Potenzierung von NR1/NR3A-Rezeptoren wichtig sind, wurden NR1- und NR3A-Konstrukte hergestellt, deren gesamte NTD entfernt wurde (NR1^{ΔNTD}, NR3A^{ΔNTD}). Die resultierenden NR1^{ΔNTD}/NR3A^{ΔNTD}-Rezeptoren zeigten qualitativ jedoch sämtliche Zn^{2+} -Effekte der Wildtyp NR1/NR3A-Rezeptoren; d.h. die Zn^{2+} -Potenzierung des Glyzin-vermittelten Stromes, die Zn^{2+} -Aktivierung bei höheren Konzentrationen sowie die supralineare Potenzierung der Glyzinantwort durch eine Kombination von MDL und Zn^{2+} (Publikation Fig. 3 A). Folglich werden die NTDs der NR1/NR3A-Rezeptoren nicht für die Zn^{2+} -Aktivierung und -Potenzierung benötigt.

Um diesen Befund weiter zu erhärten, wurden in der Ligandenbindungsdomäne (LBD) einzelne Aminosäurereste der jeweiligen NR1- und NR3A-Glyzinbindungsstellen ausgetauscht, so dass Glyzin nicht mehr an die mutierten Untereinheiten binden konnte. Es wurde bereits beschrieben, dass Glyzin an Rezeptoren mit mutierter NR3A-LBD keine Ströme mehr hervorruft, auch nicht in Gegenwart des NR1-Antagonisten MDL (siehe auch Publikation 3 dieser Arbeit). Im Gegensatz dazu blieben die Zn^{2+} -Aktivierung sowie die Potenzierung des Zink-vermittelten Stromes durch MDL unverändert (Publikation Fig. 3 B). Rezeptoren mit mutierter NR1-LBD konnten durch Zn^{2+} allein sowie in Gegenwart von MDL nicht mehr aktiviert werden (Publikation Fig. 3 C), während Glyzin aufgrund der den MDL-Effekt imitierenden Mutation große Ströme produzierte. Diese Ergebnisse bedeuten, dass NR1/NR3A-Rezeptoren durch Zn^{2+} über die NR1-LBD, und durch Glyzin über die NR3A-LBD aktiviert werden.

Zusammenfassend wurde in dieser Studie gezeigt, dass Zn^{2+} sowohl als positiver allosterischer Modulator als auch als voller Agonist an NR1/NR3A-Rezeptoren wirkt. Kooperativität zwischen der allosterischen Zn^{2+} -Potenzierung und Antagonisten der NR1-Glyzinbindungsstelle führt zu einer supralinearen, > 120-fachen Zunahme des Glyzin-aktivierten Stroms. Das weist im

Umkehrschluss auf eine extrem geringe Rezeptoreffizienz hin, wenn Glyzin der alleinige Agonist ist. Während die NR1-LBD für die Zn^{2+} -Aktivierung und -Potenzierung des Zn^{2+} - und Glyzin-induzierten Stromes verantwortlich ist, bestimmt die NR3A-LBD die Aktivierung des Rezeptors durch Glyzin.

Persönlicher Beitrag zu diesem Projekt:

Sämtliche in der Publikation beschriebenen Analysen wurden selbst durchgeführt.

4. Diskussion

In den beschriebenen Publikationen wurden zwei verschiedene Subtypen der NMDA-Rezeptorfamilie untersucht: die konventionellen, durch Glutamat und Glyzin aktivierbaren NR1/NR2-Rezeptoren und die so genannten exzitatorischen NR1/NR3-Rezeptoren, bei denen Glyzin allein zum Öffnen des Ionenkanals führt. An beiden Rezeptortypen wurde eine pharmakologische Charakterisierung anhand elektrophysiologischer Methoden durchgeführt sowie Aspekte der Rezeptorassemblierung bzw. das Verhältnis der im Rezeptorkomplex enthaltenen Untereinheiten mittels biochemischer Analysen untersucht. Während bei den konventionellen NR1/NR2-Rezeptoren vor allem die Rolle der extrazellulären, N-terminalen Domäne (NTD) auf die Rezeptorfunktion und –assemblierung analysiert wurde (Publikationen 1 und 2), stand bei den NR1/NR3-Rezeptoren deren grundlegende funktionelle Analyse im Vordergrund (Publikationen 3 und 4). Da NR1/NR2- und NR1/NR3-Rezeptoren zwar zur gleichen Rezeptorfamilie gehören, sich aber dennoch grundlegend in ihren pharmakologischen und biophysikalischen Eigenschaften unterscheiden, werden sie im Folgenden getrennt diskutiert.

4.1 Funktionelle Rolle der N-terminalen Domänen (NTDs) konventioneller NR1/NR2A- und NR1/NR2B-Rezeptoren

4.1.1 Einfluss der NTDs auf die Rezeptorsynthese

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die NTDs von ionotropen und metabotropen Glutamatrezeptoren in der Lage sind, durch gegenseitige Wechselwirkungen dimere oder multimere Assoziate zu bilden (Kuusinen et al. 1999, Kunishima et al. 2000). Bei ionotropen Glutamatrezeptoren wurden diese Wechselwirkungen mit der Assemblierung der Untereinheiten in Zusammenhang gebracht (Ayalon und Stern-Bach 2001, Papadakis et al. 2004, Matsuda et al. 2005). Die Funktion der NTDs in dem geordnet ablaufenden Prozess der NMDA-Rezeptorassemblierung wäre also bidirektional, d.h.

stabilisierende Wechselwirkungen zwischen bestimmten Untereinheiten zuzulassen, mit anderen jedoch zu verhindern. Da alle bisher bekannten NMDA-Rezeptoren zwei NR1-Untereinheiten enthalten, könnte die von einigen Gruppen beobachtete Bildung eines NTD-vermittelten NR1-NR1-Homodimers mechanistisch betrachtet ein stabiles Zwischenprodukt für die Assemblierung des tetrameren Rezeptors darstellen (Papadakis et al. 2004, Matsuda et al. 2005). Das Entfernen der NR1-NTD hat in der vorliegenden Arbeit zwar die NR1-Homodimerisierung aufgehoben, allerdings wurde nach Koexpression mit Wildtyp NR2-Untereinheiten weder die Rezeptorassemblierung noch dessen Funktion beeinträchtigt (Publikation 2 dieser Arbeit). Auch NR1/NR2A- sowie NR1/NR2B-Rezeptoren, deren NR1- und NR2-NTDs deletiert wurden, generierten Agonist-aktivierte Ströme ähnlich denen der entsprechenden Wildtyp-Rezeptoren.

Dieses Ergebnis schließt eine grundlegende Beteiligung der NTDs für die Rezeptorassemblierung aus und steht im Einklang mit Berichten anderer Gruppen (Fayyazuddin et al. 2000, Hu und Zheng 2005), bei denen das Entfernen der NR2-NTDs auch zu funktionellen Rezeptoren führte. Im Gegensatz dazu haben Meddows et al. 2001 berichtet, dass eine um 380 Aminosäuren verkürzte, also ebenso fast die gesamte NTD entbehrende, NR1-Untereinheit die Rezeptorsynthese stark beeinträchtigt. Dieser Befund ist nicht konform mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen und liegt möglicherweise an der etwas längeren N-terminalen Deletion, welche in der Studie von Meddows et al. untersucht wurde. Übereinstimmend mit den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten sind Studien an anderen Mitgliedern der Familie ionotroper Glutamaterezeptoren, bei denen natürlich vorkommende oder rekombinante Untereinheiten auch ohne NTD funktionelle Rezeptoren bilden (Chen et al. 1999, Pasternack et al. 2002).

Anhand der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse spielen demnach Wechselwirkungen zwischen den NTDs der NR1- und NR2-NMDA-Rezeptoruntereinheiten keine Rolle für die Rezeptorsynthese.

4.1.2 Mechanistische Vorstellung der NMDA-Rezeptorsynthese

Es konnte gezeigt werden, dass die NR2-Untereinheiten nicht untereinander, sondern nur in Gegenwart einer NR1-Untereinheit miteinander assoziieren (Publikation 2). In Zusammenhang mit dem Befund, dass die Homodimerisierung der NR1-Untereinheit funktionell keine Bedeutung besitzt, scheint die Bildung heterodimerer NR1-NR2 Komplexe am plausibelsten. Daraus ergibt sich ein zweistufiges Modell der Rezeptorsynthese, bei dem der grundlegende Schritt die Bildung eines NR1-NR2 Heterodimers darstellt, gefolgt von der Anlagerung eines weiteren Heterodimers zum funktionellen tetrameren Rezeptorkomplex (siehe Publikation 2, Fig. 2).

4.1.3 Einfluss der NTD auf die Modulation der Rezeptorfunktion

Obwohl die NTDs keine Bedeutung für den Zusammenbau funktioneller NR1/NR2-Rezeptoren besitzen, war die spannungsunabhängige, hochaffine Zn^{2+} - und Ifenprodilhemmung an Rezeptoren mit entfernter NR1- oder NR2-NTD aufgehoben. In bisherigen Studien wurde berichtet, dass Zn^{2+} und Ifenprodil an die NTDs der NR2-Untereinheiten binden (Paoletti et al. 1997, Perin-Dureau et al. 2002, Rachline et al. 2005). Deren exakte Bindungsstelle auf dieser NTD ist jedoch noch nicht bekannt. Die hier gefundenen Ergebnisse zeigen aber eindeutig, dass die NTD der NR1-Untereinheit ebenfalls an der allosterischen Zn^{2+} - und Ifenprodilhemmung beteiligt ist. Sowohl durch enzymatisches Abschneiden der NR1-NTD als auch nach Deletion der NR1-NTD waren beide hochaffinen Inhibitionen nicht mehr zu beobachten. Die nach Entfernung der jeweiligen NTDs verbliebenen Hemmungen setzten erst bei stark erhöhten Konzentrationen von Zn^{2+} und Ifenprodil ein und bestanden aus spannungsabhängigen und –unabhängigen Komponenten, denen vermutlich Bindungsstellen außerhalb der NTDs und innerhalb der Kanalpore zugrunde liegen (Paoletti et al. 1997, Traynelis et al. 1998, Rachline et al. 2005).

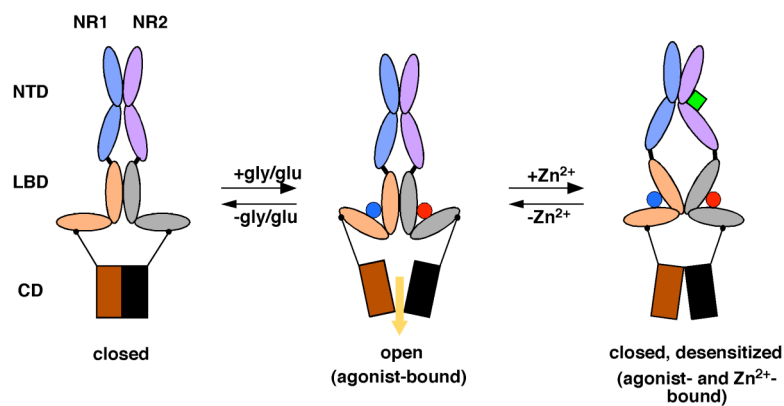
Bisherige Studien haben gezeigt, dass sich sowohl die Zn^{2+} - als auch Ifenprodil-vermittelte Inhibition von NMDA-Rezeptorströmen gemeinsame Bindungsstellen und Mechanismen teilen. Das N-terminale Binden dieser Modulatoren führt dabei zu einer pH-abhängigen, verstärkten Rezeptordesensitisierung (Chen et al. 1997, Paoletti et al. 1997 und 2000, Krupp et al. 1998, Low et al. 2000, Zheng et al. 2001). Dieses Konzept wird auch durch die hier beschriebene verminderte Desensitisierung N-terminal verkürzter Rezeptoren bestätigt.

4.1.4 Modellvorstellung der NTD-vermittelten allosterischen Hemmung

Das zur Zeit geläufige Modell, das die Aktivierung ionotroper Glutamaterezeptoren beschreibt, wurde hauptsächlich durch Studien am AMPA-Rezeptor begründet und beruht im Wesentlichen auf den folgenden Schritten (Armstrong et al. 2006, Mayer 2006): Das Binden des Agonisten an die LBD bewirkt das Schließen dieser aus den Subdomänen S1 und S2 aufgebauten zweiblättrigen Struktur, ähnlich dem Mechanismus einer Venus-Fliegenfalle (Mano et al. 1996). Dabei bilden die LBDs einer NR1- und einer NR2-Untereinheit jeweils die funktionelle Einheit des tetrameren Rezeptorkomplexes (Furukawa et al. 2005). Die S1 Regionen benachbarter LBDs sind durch starke intermolekulare Wechselwirkungen eng aneinander gelagert, so dass die konformativen Änderungen nach Bindung des Agonisten Spannungskräfte aufbauen, die in die Transmembranregion weitergeleitet werden und dort zum Öffnen des Ionenkanals führen. Basierend auf den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen wird folgender Mechanismus der NTD-vermittelten NMDA-Rezeptorhemmung postuliert (Abb.13): Das Binden eines allosterischen Modulators führt zum Schließen der Bindungstasche der NR2-NTD. Daraus resultieren konformative Spannungen, die sich auf die benachbarte LBD übertragen. Dieses hat zu Folge, dass die für die Kanalöffnung notwendigen Wechselwirkungen zwischen den NR1- und NR2-LBDs (Armstrong et al. 2006) geschwächt werden und dadurch die Rezeptordesensitisierung nach Bindung der Agonisten beschleunigt wird (Abb. 13). Das Entscheidende bzw. Neue an diesem Konzept ist, dass ein allosterischer Modulator wie Zn^{2+} oder Ifenprodil

nur dann über die jeweilige NR2-NTD wirken kann, wenn diese durch eine benachbarte NR1-NTD als „Gegenlager“ stabilisiert wird (Abb. 13). Fehlt die NR1-NTD, verursacht das Binden von Zn^{2+} oder Ifenprodil an die NR2-NTDs nicht die Konformationsänderungen, die zu einem Schwächen der Wechselwirkungen zwischen den NR1-NR2 LBDs führen. Folglich ist die allosterische Hemmung aufgehoben.

A. wild-type



B. NR1-NTD-truncated

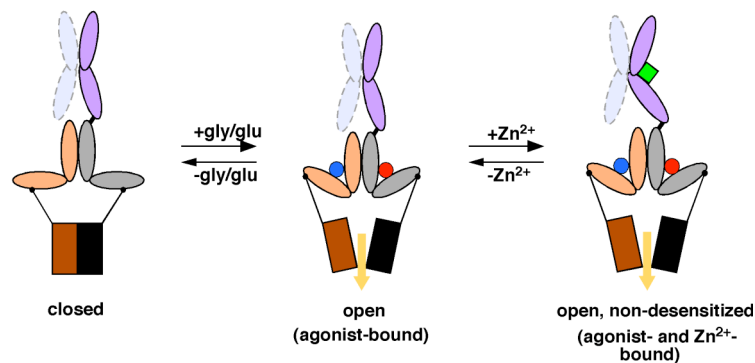


Abb. 13. Modell der NTD-vermittelten Hemmung. Das Binden von Zn^{2+} oder Ifenprodil an den offenen, Agonist-gebundenen Rezeptor führt zum Schließen der NR2-NTD. Die dadurch abgeschwächten NR1-NR2-LBD-Wechselwirkungen begünstigen das Schließen des Ionenkanals durch eine verstärkte Desensitisierung. **(A)** Wildtyp-Rezeptoren werden nach Binden von Zn^{2+} - oder Ifenprodil an die NR2-NTD verstärkt in den geschlossenen, desensitisierten Zustand getrieben. **(B)** Bei NR1-NTD-verkürzten Rezeptoren bleibt die durch Zn^{2+} - oder Ifenprodilbindung vermittelte konformative Änderung aus, so dass die NR1-NR2-LBD Wechselwirkungen nicht geschwächt werden. Folglich bleibt der Zn^{2+} -gebundene Rezeptor länger in dem offenen Zustand.

Diese mechanistische Vorstellung setzt voraus, dass auf der Ebene der NTDs die NR1- und NR2-Untereinheiten als funktionelles Heterodimer vorliegen. Diese Annahme wird durch die hier erzielten Ergebnisse bestätigt, da sowohl die NR1 als auch die NR2-NTD gleichermaßen zur hochaffinen allosterischen Zn^{2+} - und Ifenprodilinhibition beitragen. Diese Idee wird weiterhin unterstützt durch den Befund, dass die funktionelle Einheit auf Ebene der LBDs ein NR1-NR2 Heterodimer darstellt (Furukawa et al. 2005).

4.1.5 Beitrag der NTDs zur apparenten Agonistenaffinität

Das pharmakologische Profil von NMDA-Rezeptoren wird maßgeblich durch die Isoformen der NR2-Untereinheit beeinflusst (Laurie und Seeburg 1994, Übersicht in Cull-Candy et al. 2001). Obwohl NR1/NR2A- und NR1/NR2B-Rezeptoren über die identische Glyzin-bindende NR1-Untereinheit verfügen, weisen NR2B-enthaltende Rezeptoren eine ca. 10-fach höhere Glyzinaffinität auf als solche, die aus NR1- und NR2A-Untereinheiten aufgebaut sind.

Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die apparente Affinität des Ko-Agonisten Glyzin durch die NTDs der NR2-Untereinheiten mitbestimmt wird. In diesem Zusammenhang wurde bereits berichtet, dass Mutationen in den NR2-NTDs die apparente Glyzinaffinität beeinflussen (Choi et al. 2001). Da die Glyzinbindungsstelle in der LBD der NR1-Untereinheit liegt (Kuryatov et al. 1994), scheinen spezifische Wechselwirkungen zwischen den NR1- und NR2-Untereinheiten zu existieren, die an der Regulation der Glyzinaffinität beteiligt sind. Dieser Befund unterstützt die Idee, dass die funktionelle Einheit des tetrameren NMDA-Rezeptorkomplexes ein NR1-NR2 Heterodimer darstellt.

Die hier beschriebenen Ergebnisse können durch allosterische Wechselwirkungen zwischen den NTDs der NMDA-Rezeptoruntereinheiten erklärt werden. Diese bestimmen sowohl die Affinität der Glyzinbindung an die NR1-Untereinheit als auch die Effizienz der allosterischen Rezeptorinhibition durch Zn^{2+} und Ifenprodil.

4.1.6 Physiologische Bedeutung der NTD-vermittelten Effekte

Die übermäßige Aktivierung von NMDA-Rezeptoren führt durch einen stark erhöhten Ca^{2+} -Einstrom zum Absterben von Neuronen (Überblick siehe Cull-Candy et al. 2001). Eine endogen auftretende Modulation nativer NMDA-Rezeptoren stellt dessen tonische Hemmung durch ambiente Zn^{2+} Konzentrationen dar. *In-vitro*-Studien zufolge schützt dieser Mechanismus Neuronen vor NMDA-Rezeptor-vermittelter Glutamatoxizität (Chen et al. 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde unter anderem gezeigt, dass die allosterische Zn^{2+} -Hemmung von NR1/NR2A- und NR1/NR2B-Rezeptoren nach dem enzymatischen Abschneiden der NR1-NTD durch die Serinprotease Thrombin aufgehoben ist. In diesem Zusammenhang wurde berichtet, dass der Gewebefibrinogen-Aktivator t-PA, ebenso eine Serinprotease, an pathophysiologischen Aspekten der glutamatergen Erregungsübertragung zwischen Nervenzellen beteiligt ist (Nicole et al. 2001, Fernandez-Monreal et al. 2004). Weiterhin wurde berichtet, dass nach Blockade der Serinprotease t-PA der NMDA-Rezeptor-vermittelte exzitatorische Zelltod vermindert wird (Nicole et al. 2001). Möglicherweise hängen die t-PA-induzierten Effekte mit einer Verminderung oder Aufhebung der endogenen tonischen Zn^{2+} -Hemmung von NMDA-Rezeptoren zusammen. Da die Serinprotease Thrombin effektiv die NTD der NR1-Untereinheit entfernt, ist eine ähnliche Abspaltung an endogen vorkommenden Erkennungssequenzen in den nativen NR1- oder NR2-Untereinheiten auch für die Serinprotease t-PA denkbar. Der resultierende Verlust der tonischen Zn^{2+} -Hemmung von NMDA-Rezeptoren sollte einen erhöhten Ca^{2+} -Einstrom zur Folge haben und somit neuronalen Zelltod auslösen. Dieser Mechanismus sollte besonders effektiv an synaptisch lokalisierten NR1/NR2A-Rezeptoren sein, da deren Zn^{2+} Affinität besonders hoch ist (Paoletti et al. 1997).

4.2 Funktionelle Charakterisierung von NR1/NR3-NMDA-Rezeptoren

Der zunächst auffälligste Unterschied zwischen konventionellen Glutamat- und Glyzin-aktivierten NR1/NR2-Rezeptoren und den ausschließlich Glyzin-aktivierbaren NR1/NR3-Rezeptoren betrifft die Größe der Agonist-vermittelten Rezeptorströme. Während konventionelle Rezeptoren große Kationenströme generieren und eine hohe Permeabilität für Ca^{2+} besitzen (siehe Übersicht in Cull-Candy et. al. 2004), produzieren NR1/NR3-Rezeptoren vergleichsweise kleine, kaum Ca^{2+} -permeable und schnell desensitisierende Ströme (Chatterton et al. 2002). Trotz der geringen Funktion dieser - bisher vor allem im Oozytenexpressionssystem untersuchten - Rezeptoren gibt es hinsichtlich der Menge Zellmembran-gebundener und damit potentiell aktivierbarer NR1/NR3-Rezeptoren keine erkennbaren Unterschiede zu denen des NR1/NR2-Typs (siehe Publikation 3 dieser Arbeit). Folglich scheint den NR3-Untereinheiten eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von NR1/NR3-Rezeptoren zuzukommen.

4.2.1 Einfluss der Ligandenbindungsdomänen (LBDs) auf die Aktivierung von NR1/NR3-Rezeptoren

Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die NR1- und NR3-Untereinheiten einen unterschiedlichen, entgegengesetzten Einfluss auf die Funktion von NR1/NR3-Rezeptoren haben. Dabei führen Antagonisten der NR1-Glyzinbindungsstelle sowie Mutationen, die das Binden von Glyzin an die NR1-LBD beeinträchtigen, zu großen Glyzin-aktivierten NR1/NR3-Rezeptorströmen. Im Gegensatz dazu bewirkt das Antagonisieren der NR3-Glyzinbindungsstelle eine starke Verminderung oder gar vollständige Aufhebung der Glyzin-vermittelten Ströme. Bindungsstudien mit löslichen, isolierten LBDs haben gezeigt, dass Glyzin an die NR3A-Untereinheit mit einer etwa 650-fach höheren Affinität bindet als an die NR1-LBD (Yao und Mayer 2006, Ivanovic et al. 1998). Auf Grundlage dieser unterschiedlichen Glyzinaffinitäten wird eine sequenzielle Besetzung der NR3- und NR1-Bindungsstellen angenommen. Diese mechanistische Vorstellung

liefert eine mögliche Erklärung für das spezielle Aktivierungsmuster von NR1/NR3A-Rezeptoren. Glyzin würde durch das bevorzugte Binden an die LBD der NR3A-Untereinheit den Ionenkanal zunächst aktivieren, gefolgt von einer Inaktivierung des Rezeptors sobald die niedriger affine NR1-Bindungsstelle besetzt ist. Folglich führen sättigende Konzentrationen von Glyzin zu einem transienten, schnell desensitisierenden Rezeptorstrom (siehe Publikation 3 dieser Arbeit).

4.2.2 Modell zum Mechanismus der Glyzinwirkung an NR1/NR3-Rezeptoren

Die entgegengesetzten Einflüsse der NR1- und NR3-Glyzinbindungsstellen, die zu dem beschriebenen bidirektionalen Aktivierungsmuster von NR1/NR3-Rezeptoren führen, sind mit bisherigen Modellvorstellungen der Ligandenbindung und Ionenkanalaktivierung ionotroper Glutamaterezeptoren vereinbar (Mayer 2006). Über den Aktivierungsmechanismus von AMPA-Rezeptoren wurde berichtet, dass der Grad der Schließung der LBD nach Bindung verschiedener Agonisten mit der Stärke des induzierten Rezeptorstroms korreliert (Armstrong und Gouaux 2000). Demnach führt das Binden von Glyzin an die NR3-Untereinheit zum Schließen der Bindungstasche, so dass auch ohne Besetzung der Glyzinbindungsstelle auf der NR1-Untereinheit die resultierenden Konformationsänderungen in der NR3-LBD ausreichen, um den Ionenkanal zu öffnen. Das nachfolgende Binden von Glyzin an die niedriger affine NR1-LBD bewirkt eine Schwächung der Wechselwirkungen zwischen den NR1-NR2 LBDs (Abb. 14 A, s.u.), so dass der Rezeptor in den geschlossenen, desensitisierten Zustand getrieben wird (Armstrong et al., 2006). Diese Annahme wird bestätigt durch die hier beschriebenen Ergebnisse, welche zeigen, dass die kleinen und schnell desensitisierenden NR1/NR3-Rezeptorströme durch kompetitive NR1-Antagonisten oder Mutationen in der NR1-LBD in potenzierte und kaum mehr desensitisierende Ströme überführt werden (Abb. 14 B und C). Im Gegensatz dazu wirken NR3-Antagonisten oder Mutationen in der NR3-LBD der

Rezeptoraktivierung entgegen, indem sie das Schließen der NR3-LBD verhindern und somit der Ionenkanal nicht geöffnet werden kann (Abb. 14 C).

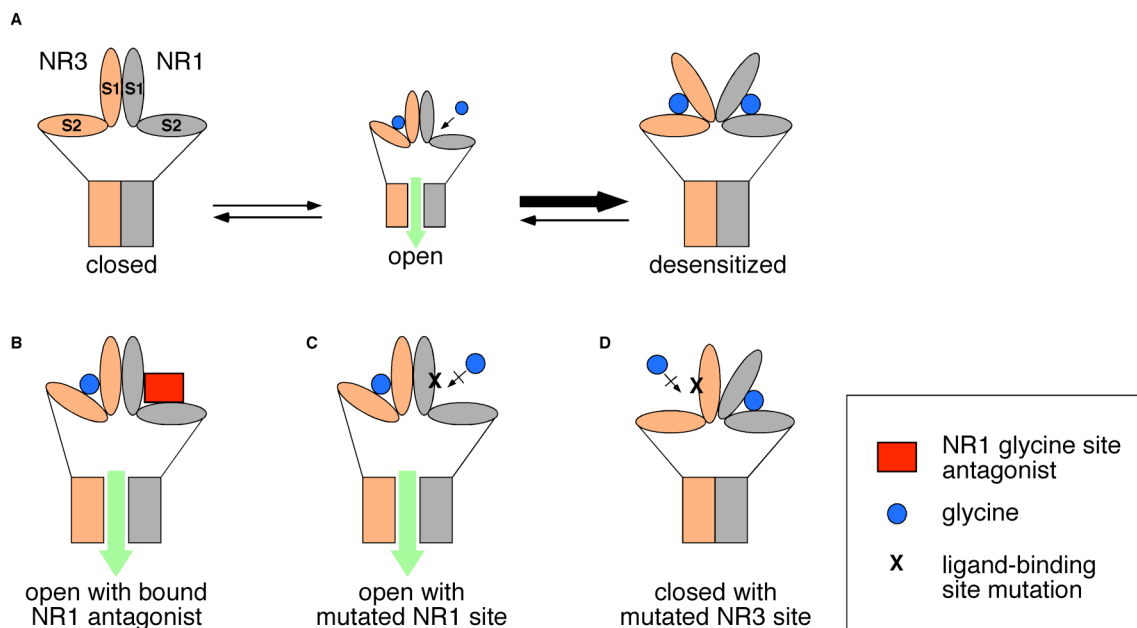


Abb. 14. Schematisches Modell der geschlossenen und offenen Zustände von NR1/NR3-Rezeptoren. (A) Das sequentielle Binden von Glyzin an die NR3- und NR1-LBDs führt zunächst zum kurzzeitigen Öffnen des Ionenkanals (Mitte) gefolgt von der Umlagerung in den geschlossenen, desensibilisierten Zustand (rechts). (B) Die Gegenwart eines NR1-Antagonisten führt nach Bindung von Glyzin an die NR3-LBD zur Kanalöffnung und verhindert ein Desensibilisieren, wodurch ein großer Rezeptorstrom resultiert. (C) Mutationen in der NR1-LBD haben die gleichen Effekte wie ein NR1-Antagonist. (D) Im Gegensatz dazu führen Mutationen in der NR3-LBD zu einem Verlust der Rezeptoraktivierung. (Die Stärke des Pfeils korreliert mit der Größe des induzierten Rezeptorstroms. Zur vereinfachten Darstellung sind nur zwei Untereinheiten des tetrameren Rezeptors gezeigt.)

4.2.3 Zink ist ein Agonist an NR1/NR3A-Rezeptoren

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Zn^{2+} an NR1/NR3A-Rezeptoren ähnlich große Maximalströme hervorrufen kann wie Glyzin, das bisher als alleiniger Agonist an NR1/NR3-Rezeptoren beschrieben wurde (Chatterton et al. 2002). Die dafür benötigte halbmaximale Zn^{2+} -Konzentration ist allerdings um den Faktor 25 größer als bei Glyzin, so dass die maximale Stromantwort erst bei ungefähr 1 mM Zn^{2+} erreicht wird. Unter physiologischen Bedingungen sind solche Konzentrationen nicht zu erreichen, so dass Glyzin mit seiner wesentlich höheren apparenten Affinität (ca. 6 μM) als eigentlicher Agonist an nativen

NR1/NR3A-Rezeptoren betrachtet werden muss. Eine interessante Parallele stellt der zur Familie der Cys-Loop-Rezeptoren gehörende, pentamere Glyzinrezeptor dar. Hier wurde gezeigt, dass durch Punktmutationen in der Glyzinbindungsstelle der $\alpha 1$ -Untereinheit die Aktivierung durch Glyzin verloren geht und stattdessen Zn^{2+} den Ionenkanal selektiv öffnen kann (Grudzinska et al. 2008). Dieser Befund legt nahe, dass Zn^{2+} unter bestimmten Umständen ähnliche oder zum Teil identische Bindungsstrukturen wie Glyzin benutzt und somit dessen Wirkungen imitieren kann. Bezogen auf den NR1/NR3A-Rezeptor bedeutet dies, dass Zn^{2+} und Glyzin benachbarte Bindungsstellen besitzen bzw. an zum Teil identische Aminosäurereste der NR1-Untereinheit binden.

4.2.4 Supralineare Potenzierung von NR1/NR3A-Rezeptoren

Ein bedeutender Befund der vorliegenden Arbeit stellt die bis zu 10-fache Potenzierung des maximalen Glyzin-induzierten NR1/NR3A-Stroms durch mikromolare, also nicht bzw. kaum aktivierende Konzentrationen von Zn^{2+} dar. Makroskopisch betrachtet ähnelt diese Potenzierung jener, die durch NR1 Antagonisten (MDL) oder Mutationen in der NR1-Bindungstasche hervorgerufen wird. Gleichzeitiges Applizieren von MDL und nicht-aktivierenden Zn^{2+} -Konzentrationen führte jedoch nicht zu einem Verdecken des etwas schwächeren Zn^{2+} -Effektes oder zu einer Addition beider Potenzierungen, sondern ergab eine > 120 -fache Erhöhung des Glyzin-aktivierten Stroms. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die der Zn^{2+} - und MDL-Potenzierung zugrunde liegenden Mechanismen nicht identisch sein können. Vielmehr verstärken sie in einer hochkooperativen Weise die Effizienz des Rezeptors. Zurzeit stellt diese supralineare Potenzierung des NR1/NR3A-Rezeptors durch Zn^{2+} und MDL eine einzigartige Modulation ligandengesteuerter Rezeptoren dar.

Bisher existieren nur wenige Studien, die das Vorkommen bzw. die Aktivierung nativer NR1/NR3-Rezeptoren beschreiben. Die hier aufgezeigte supralineare Potenzierung könnte eine Strategie darstellen, um NR1/NR3-Rezeptoren *in vivo* einfacher zu detektieren und funktionell eingehender zu charakterisieren.

4.2.5 Schlussfolgerungen zum Aktivierungsmechanismus von NR1/NR3A-Rezeptoren

Die bidirektionale Wirkung von Glyzin an den NR1- und NR3A-LBDs wurde bereits vorhin beschrieben (Kapitel 4.2.2). Mutationsanalysen lassen den Schluss zu, dass die Zn^{2+} -vermittelten Effekte, d.h. die Potenzierung Glyzin-aktivierter Ströme sowie die bei höheren Zn^{2+} -Konzentrationen ($> 50 \mu\text{M}$) ausgelöste Aktivierung von NR1/NR3A-Rezeptoren, durch die LBD der NR1-Untereinheit bestimmt werden (Abb. 15, s.u.). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen wurde in Bindungsstudien gefunden, dass Zn^{2+} an eine lösliche NR1-LBD binden kann (Stoll et al. 2007). Eine Möglichkeit, die potenzierenden und aktivierenden Zn^{2+} -Effekte mechanistisch zu erklären, basiert auf der Annahme, dass die LBDs der beiden NR1-Untereinheiten nacheinander durch Zn^{2+} besetzt werden. Demnach würde die potenzierende Wirkung von Zn^{2+} auf einer Besetzung von nur einer NR1-Untereinheit beruhen, während die Ligandierung beider NR1-Untereinheiten durch Zn^{2+} genügend Bindungsenergie bereitstellt, um den Ionenkanal zu öffnen. Andererseits wären die Zn^{2+} -Effekte auch durch die Annahme von zwei Bindungsstellen je NR1-LBD erklärbar, d.h. einer hochaffinen für die Zn^{2+} -Potenzierung, und einer niedriger affinen für die Zn^{2+} -Aktivierung. Zur Untersuchung dieser Alternativen sind weitere Experimente notwendig.

Da der kompetitive NR1-Glyzinantagonist MDL auch die Zn^{2+} -aktivierten Ströme potenziert, können die Bindungsstellen von Glyzin und Zn^{2+} nicht identisch sein, obwohl ein partielles Überlappen derselben nicht ausgeschlossen werden kann. Diese Deutung wird durch den Befund unterstützt, dass MDL zwar die apparente Glyzinaffinität drastisch erniedrigt, diejenige von Zn^{2+} aber nicht beeinflusst. Desweiteren verändert Zn^{2+} auch nicht den EC_{50} -Wert von Glyzin, was eine direkte Konkurrenz beider Liganden um die gleiche Bindungsstelle ausschließt. Folglich scheinen unterschiedliche Mechanismen bzw. Bindungsstellen für die potenzierenden Wirkungen von Zn^{2+} und MDL auf den Glyzin-induzierten NR1/NR3A-Rezeptorstrom verantwortlich zu sein (Abb. 15, s.u.).

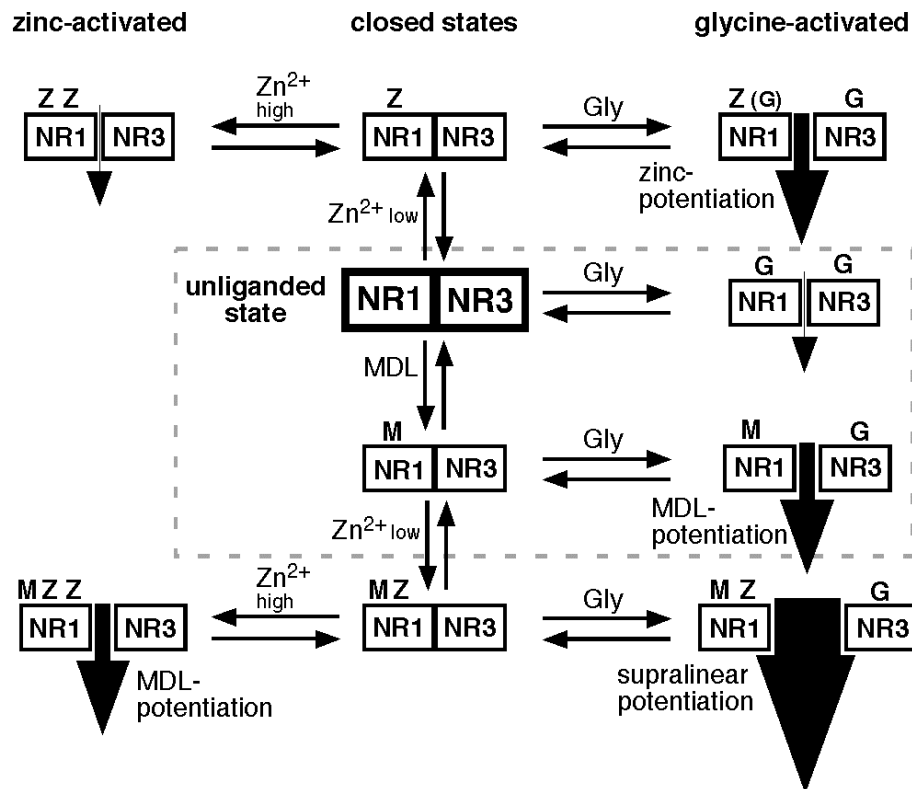


Abb. 15. Schema der geschlossenen und offenen Zustände von NR1/NR3A-Rezeptoren.

Zn²⁺ (Z) und MDL (M) binden an die NR1-Untereinheit, während Glyzin (Gly; G) sowohl über die NR1- als auch NR3A-LBDs wirkt. Konzentrationen von Zn²⁺ < 100 µM sind als „Zn²⁺ low“, solche > 100 µM als „Zn²⁺ high“ bezeichnet. Die Aktivierung des Rezeptors führt zu Ionenströmen unterschiedlicher Stärke, die als schwarze Pfeile verschiedener Dicke symbolisiert sind. Die derzeit in der Literatur beschriebenen geschlossenen und offenen Zustände von NR1/NR3A-Rezeptoren sind mit einer gestrichelten Linie umgeben. NR1-NR3A Dimere sind als Boxen dargestellt.

Der Befund, dass die gleichzeitige Besetzung der NR1-LBD durch Zn²⁺ und MDL zu einer supralinearen Potenzierung des Glyzin-aktivierten Stroms führt (Abb. 15, s.u.), deutet darauf hin, dass hochkooperative Wechselwirkungen der vollständig ligandierten Untereinheiten für die maximale Aktivierung des Ionenkanals verantwortlich sein müssen. Diese Form von Potenzierung ist wahrscheinlich auf eine starke Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit und/oder der Einzelkanalleitfähigkeit von NR1/NR3A-Rezeptoren zurückzuführen, was durch zukünftige Studien genauer zu untersuchen ist.

4.2.6 Funktioneller Vergleich zwischen NR1/NR2- und NR1/NR3-NMDA-Rezeptoren

NR1/NR3A-Rezeptoren können mit niedriger Effizienz sowohl durch Zn^{2+} über die NR1-LBD als auch durch Glyzin über die NR3A-LBD aktiviert werden. Ein gleichzeitiges Besetzen beider Bindungsstellen durch Zn^{2+} und Glyzin führt zu einer wesentlich effizienteren Aktivierung des Ionenkanals. Dieses Szenario ähnelt stark der Situation in NR1/NR2-Rezeptoren, bei denen das gleichzeitige Binden von Glyzin an die NR1- und von Glutamat an die NR2-Untereinheit eine grundlegende Voraussetzung für eine effiziente Kanalöffnung darstellt. Im Gegensatz zu NR1/NR2-Rezeptoren führt das Binden von Glyzin an die NR1-LBD von NR1/NR3-Rezeptoren zu einer verstärkten Desensibilisierung des Stroms und wirkt sich somit negativ auf dessen Funktion aus. Da die Mechanismen der Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung innerhalb der NMDA-Rezeptorfamilie hochkonserviert sind, deuten die unterschiedlichen Glyzinwirkungen zwischen NR1/NR2- und NR1/NR3-Rezeptoren auf den komplexen Einfluss der NR1-LBD auf die Rezeptorfunktion hin. Ähnlich gegensätzlich verhalten sich auch die Effekte von Zn^{2+} , welches NR1/NR2-Rezeptoren allosterisch hemmt, aber an NR1/NR3A-Rezeptoren potenzierende und aktivierende Eigenschaften besitzt. Die Wirkungen von Zn^{2+} und Glyzin an NR1/NR2- und NR1/NR3-Rezeptoren zeigen, dass sich das pharmakologische Profil von NMDA-Rezeptoren durch den Einbau von NR3-Untereinheiten grundlegend ändert.

4.2.7 Physiologische Schlussfolgerungen

Die funktionelle Bedeutung nativer NR1/NR3-Rezeptoren ist noch nicht eindeutig geklärt, da derzeit nur wenige Studien Indizien für deren Existenz *in vivo* liefern (Chatterton et al. 2002, Matsuda et al. 2003, Tong et al. 2008). Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über das Aktivierungsverhalten von NR1/NR3-Rezeptoren zeigen, dass mindestens zwei Liganden nötig sind, um den Ionenkanal wirkungsvoll zu öffnen. Dieser Befund lässt vermuten, dass

neben Glyzin möglicherweise noch ein zweiter, bisher nicht entdeckter endogener Ligand an diese Rezeptoren bindet. Bisherigen Studien zufolge kann die freie Konzentration von Zn^{2+} im Nervengewebe auf bis zu $10 \mu\text{M}$ ansteigen (Fredericson et al. 2006). Diese Konzentration ist für die direkte Aktivierung von NR1/NR3A-Rezeptoren zu niedrig, reicht aber aus, um die Glyzin-aktivierten Ströme etwa 4-fach zu potenzieren, so dass die hier beschriebene Zn^{2+} -Potenzierung physiologisch von Bedeutung sein könnte.

Für die Existenz nativer NMDA-Rezeptoren, welche aus NR1-, NR2- und NR3-Untereinheiten aufgebaut sind, gibt es derzeit erhebliche mehr Beweise (Tong et al. 2008). Funktionell führt der Austausch einer NR2- mit einer NR3-Untereinheit bei diesen heterotrimeren Rezeptoren zu geringeren Agonist-induzierten Strömen, verglichen mit konventionellen NR1/NR2-Rezeptoren (Das et al. 1998). Physiologisch sind NR3-Untereinheiten enthaltende Rezeptoren für die Regulation der Dichte dendritischer Dornen von Nervenzellen (Das et al. 1998) sowie für den Ablauf der Myelinisierung von Oligodendrozyten von Bedeutung (Stys und Lipton 2008, Micu et al. 2006, Karodittir et al. 2005, Salter und Fern 2005). Möglicherweise sind diese Rezeptoren auch an einer Vielzahl Myelin-assoziiierter Erkrankungen wie z.B. vaskuläre Demenz oder Multiple Sklerose beteiligt.

Da sich die heterotrimeren NR1/NR2/NR3-Rezeptoren funktionell aus einem NR1-NR2 Dimer sowie einem NR1-NR3 Dimer zusammensetzen (Publikation 2 dieser Arbeit, Furukawa et al. 2005), ist anzunehmen, dass sich die an NR1/NR3-Rezeptoren beobachteten Mechanismen zumindest teilweise auch auf die heterotrimeren Rezeptoren übertragen lassen. Die hier beschriebenen Potenzierungsmechanismen könnten genutzt werden, um Wirkstoffe zu entwickeln, mit denen solche Myelin-assoziierten Erkrankungen wirkungsvoller zu therapieren sind.

4.3 Schlussfolgerungen und Ausblick

Ein zentraler Aspekt der vorliegenden Arbeit war es, die funktionelle Rolle der NTDs von NMDA-Rezeptoruntereinheiten zu untersuchen. Obwohl diese ca. 400 Aminosäuren umfassende Region bis zu 50% des Molekulargewichts ionotroper Glutamatrezeptoren ausmacht, ist ihre physiologische Funktion noch weitgehend unbekannt. Die NTD ist in der Evolution der Glutamatrezeptoren erst später hinzugekommen, da diese Region bei dem prokaryontischen Glutamatrezeptor GluR0 nicht vorhanden ist (Chen et al. 1999). Für AMPA-Rezeptoren existieren Studien, welche den NTDs eine Rolle bei der Ausbildung dendritischer Dornen (Passafaro et al. 2003) sowie der Assemblierung der Untereinheiten zu heteromeren, nicht aber homomeren Rezeptoren zuschreiben (Ayalon und Stern-Bach 2001, Kuusinen et al. 1999, Madden 2002). Auch scheint die Funktion von AMPA-Rezeptoren nicht von den NTDs abzuhängen (Chen et al. 1999, Pasternack et al. 2002). Die hier gefundenen Ergebnisse schließen zwar ebenso eine grundsätzliche Rolle für die Assemblierung und Funktion von NR1/NR2A- und NR1/NR2B-NMDA-Rezeptoren aus, zeigen aber, dass die NTDs die hochaffine allosterische Zn^{2+} - und Ifenprodil-Inhibition dieser Rezeptoren bestimmen. Ob die NTD-vermittelte NMDA-Rezeptormodulation auch von physiologischer Bedeutung ist, müssen zukünftige Studien klären. Für non-NMDA-Rezeptoren wurden bisher noch keine Liganden gefunden, die an deren NTDs binden und die Rezeptorfunktion modulieren. Eine kürzlich veröffentlichte Studie deutet auch auf Wechselwirkungen der NTD mit präsynaptischen Proteinen hin (Sia et al. 2007). Dabei scheinen axonal freigesetzte Stoffe durch Binden an die NTD der GluR4-Untereinheit die synaptische Lokalisation von GluR4-AMPA-Rezeptoren zu steuern. Aufgrund ihrer Größe und exponierten Lage im extrazellulären Raum sind multiple präsynaptische Bindungspartner der NTDs vorstellbar, was ein neuartiges Prinzip der retrograden Kommunikation zwischen Prä- und Postsynapse darstellen würde. Mittels Elektronenmikroskopie wurde gezeigt, dass die NTDs von homomeren GluR2-AMPA-Rezeptoren Dimere ausbilden, die sich nach Glutamat-Aktivierung des Rezeptors voneinander weg bewegen (Nakagawa et al. 2005). Dies bedeutet, dass der Aktivierungszustand des Rezeptors durch

konformative Änderungen der NTDs in einer retrograden Weise zu potentiellen, axonal lokalisierten Faktoren signalisiert werden könnte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass über die NTDs nicht nur die Rezeptormodulation reguliert werden kann, sondern auch Signale zwischen den postsynaptisch lokalisierten Rezeptoren und präsynaptischen Proteinen ausgetauscht werden könnten. Somit kann die Frage nach der physiologischen Relevanz der NTDs von eukaryontischen Glutamaterezeptoren zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht zufriedenstellend beantwortet werden.

Die hier durchgeführte pharmakologische Untersuchung von NR1/NR3-Rezeptoren zeigt, dass die geringe Aktivierungseffizienz durch den einzig bekannten Agonisten Glyzin in vielfältiger Weise moduliert werden kann. Die Tatsache, dass ein NR1-Antagonist die Glyzin-induzierten Ströme potenziert, während der AMPA-Rezeptor-Antagonist CNQX inhibierend wirkt, kann eine Erklärung dafür liefern, dass bisher nur wenige Studien eine funktionelle Rolle von NR1/NR3-Rezeptoren *in vivo* nahelegen (Chatterton et al. 2002, Matsuda et al. 2003). Der weit verbreitete Einsatz von CNQX für die "selektive" Analyse nativer NMDA-Rezeptoren in Primärkulturen oder akut isolierten Hirnschnitten würde daher nicht nur AMPA-Rezeptoren, sondern auch potentiell vorhandene NR1/NR3-Rezeptoren ausschalten. Dies sollte in zukünftigen Studien, welche die Rolle nativer NR1/NR3-Rezeptoren adressieren, berücksichtigt werden. Ein bedeutendes Ergebnis ist, dass Zn^{2+} die Glyzin-aktivierten Ströme von NR1/NR3A-Rezeptoren bis zu 10-fach potenziert. Demnach könnte in Zn^{2+} -reichen Hirnregionen, wie z.B. dem Moosfasersystem des Hippocampus (Frederickson et al. 2005), die Funktion dieser Rezeptoren durch endogen freigesetztes Zn^{2+} aktivitätsabhängig gesteuert werden. In diesem Zusammenhang wurde berichtet, dass die Übertragungsstärke der Moosfaser-CA3-Pyramidenzell-Synapse über einen Zn^{2+} -abhängigen Mechanismus potenziert wird (Huang et al. 2008). Der Befund, dass eine Kombination von Zn^{2+} und NR1-Antagonist NR1/NR3A-Rezeptoren in einer supralinearen Weise >120-fach potenziert, lässt darüber hinaus vermuten, dass neben Zn^{2+} ein weiterer, bisher nicht entdeckter endogener Ligand die Funktion von z.B. MDL übernehmen könnte. Weitere Studien sollten zudem klären, welche

biophysikalischen Mechanismen für die starke Zunahme des Rezeptorstroms verantwortlich sind. Wahrscheinlich geschieht dies über eine Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit; auch eine Zunahme der Einzelkanalleitfähigkeit ist nicht auszuschließen. Außerdem sollte in zukünftigen Studien untersucht werden, inwieweit sich die pharmakologischen Eigenschaften der NR1/NR3-Rezeptoren auf solche übertragen lassen, die aus NR1-, NR2- und NR3-Untereinheiten aufgebaut sind. Dies ist besonders interessant vor dem Hintergrund, dass NR1/NR2- und NR1/NR3-Rezeptoren völlig entgegengesetzt durch Zn^{2+} oder MDL moduliert werden, sich die NR1/NR2/NR3-Rezeptoren aber funktionell aus einem NR1-NR2- und einem NR1-NR3-Dimer zusammensetzen.

5. Literaturverzeichnis

- Araki K, Meguro H, Kushiya E, Takayama C, Inoue Y and Mishina M (1993) Selective expression of the glutamate receptor channel delta 2 subunit in cerebellar Purkinje cells. *Biochem Biophys Res Commun* **197**(3):1267-1276.
- Armstrong N and Gouaux E (2000) Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core. *Neuron* **28**(1):165-181.
- Armstrong N, Jasti J, Beich-Frandsen M and Gouaux E (2006) Measurement of conformational changes accompanying desensitization in an ionotropic glutamate receptor. *Cell* **127**(1):85-97.
- Armstrong N, Sun Y, Chen GQ and Gouaux E (1998) Structure of a glutamate-receptor ligand-binding core in complex with kainate. *Nature* **395**(6705):913-917.
- Ascher P and Nowak L (1988) The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture. *J Physiol* **399**:247-266.
- Ayalon G and Stern-Bach Y (2001) Functional assembly of AMPA and kainate receptors is mediated by several discrete protein-protein interactions. *Neuron* **31**(1):103-113.
- Ballivet M, Patrick J, Lee J and Heinemann S (1982) Molecular cloning of cDNA coding for the gamma subunit of Torpedo acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(14):4466-4470.
- Banke TG and Traynelis SF (2003) Activation of NR1/NR2B NMDA receptors. *Nat Neurosci* **6**(2):144-152.
- Baron BM, Harrison BL, McDonald IA, Meldrum BS, Palfreyman MG, Salituro FG, Siegel BW, Slone AL, Turner JP and White HS (1992) Potent indole- and quinoline-containing N-methyl-D-aspartate antagonists acting at the strychnine-insensitive glycine binding site. *J Pharmacol Exp Ther* **262**(3):947-956.
- Bliss TV and Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* **232**(2):331-356.
- Chatterton JE, Awobuluyi M, Premkumar LS, Takahashi H, Talantova M, Shin Y, Cui J, Tu S, Sevarino KA, Nakanishi N, Tong G, Lipton SA and Zhang D (2002) Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* **415**(6873):793-798.

- Chen GQ, Cui C, Mayer ML and Gouaux E (1999) Functional characterization of a potassium-selective prokaryotic glutamate receptor. *Nature* **402**(6763):817-821.
- Chen N, Moshaver A and Raymond LA (1997) Differential sensitivity of recombinant N-methyl-D-aspartate receptor subtypes to zinc inhibition. *Mol Pharmacol* **51**(6):1015-1023.
- Chen PE and Wyllie DJ (2006) Pharmacological insights obtained from structure-function studies of ionotropic glutamate receptors. *Br J Pharmacol* **147**(8):839-853.
- Choi Y, Chen HV and Lipton SA (2001) Three pairs of cysteine residues mediate both redox and Zn^{2+} modulation of the nmda receptor. *J Neurosci* **21**(2):392-400.
- Choi YB and Lipton SA (1999) Identification and mechanism of action of two histidine residues underlying high-affinity Zn^{2+} inhibition of the NMDA receptor. *Neuron* **23**(1):171-180.
- Ciabarra AM, Sullivan JM, Gahn LG, Pecht G, Heinemann S and Sevarino KA (1995) Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family. *J Neurosci* **15**(10):6498-6508.
- Cooke SF and Bliss TV (2006) Plasticity in the human central nervous system. *Brain* **129**(Pt 7):1659-1673.
- Cull-Candy S, Brickley S and Farrant M (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* **11**(3):327-335.
- Cull-Candy SG and Leszkiewicz DN (2004) Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE* **2004**(255):re16.
- Das S, Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Takasu M, Crandall JE, Dikkes P, Conner DA, Rayudu PV, Cheung W, Chen HS, Lipton SA and Nakanishi N (1998) Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature* **393**(6683):377-381.
- Del Castillo J and Katz B (1957) Interaction at end-plate receptors between different choline derivatives. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **146**(924):369-381.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D and Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* **51**(1):7-61.
- Fayyazuddin A, Villarroel A, Le Goff A, Lerma J and Neyton J (2000) Four residues of the extracellular N-terminal domain of the NR2A subunit control high-affinity Zn^{2+} binding to NMDA receptors. *Neuron* **25**(3):683-694.

- Fernandez-Monreal M, Lopez-Atalaya JP, Benchenane K, Cacquevel M, Dulin F, Le Caer JP, Rossier J, Jarrige AC, Mackenzie ET, Colloc'h N, Ali C and Vivien D (2004) Arginine 260 of the amino-terminal domain of NR1 subunit is critical for tissue-type plasminogen activator-mediated enhancement of N-methyl-D-aspartate receptor signaling. *J Biol Chem* **279**(49):50850-50856.
- Frederickson CJ, Giblin LJ, 3rd, Balaji RV, Masalha R, Zeng Y, Lopez EV, Koh JY, Chorin U, Besser L, Hershfinkel M, Li Y, Thompson RB and Krezel A (2006) Synaptic release of zinc from brain slices: factors governing release, imaging, and accurate calculation of concentration. *J Neurosci Methods* **154**(1-2):19-29.
- Frederickson CJ, Koh JY and Bush AI (2005) The neurobiology of zinc in health and disease. *Nat Rev Neurosci* **6**(6):449-462.
- Furukawa H and Gouaux E (2003) Mechanisms of activation, inhibition and specificity: crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core. *EMBO J* **22**(12):2873-2885.
- Furukawa H, Singh SK, Mancusso R and Gouaux E (2005) Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* **438**(7065):185-192.
- Gielen M, Le Goff A, Stroebel D, Johnson JW, Neyton J and Paoletti P (2008) Structural rearrangements of NR1/NR2A NMDA receptors during allosteric inhibition. *Neuron* **57**(1):80-93.
- Giraudat J, Devillers-Thiery A, Auffray C, Rougeon F and Changeux JP (1982) Identification of a cDNA clone coding for the acetylcholine binding subunit of Torpedo marmorata acetylcholine receptor. *EMBO J* **1**(6):713-717.
- Grudzinska J, Schumann T, Schemm R, Betz H and Laube B (2008) Mutations within the agonist-binding site convert the homomeric α_1 glycine receptor into a Zn^{2+} -activated chloride channel. *Channels* **2**(1):1-6.
- Henson MA, Roberts AC, Salimi K, Vadlamudi S, Hamer RM, Gilmore JH, Jarskog LF and Philpot BD (2008) Developmental Regulation of the NMDA Receptor Subunits, NR3A and NR1, in Human Prefrontal Cortex. *Cereb Cortex*.
- Herin GA and Aizenman E (2004) Amino terminal domain regulation of NMDA receptor function. *Eur J Pharmacol* **500**(1-3):101-111.
- Hille B (1986) Ionic channels: molecular pores of excitable membranes. *Harvey Lect* **82**:47-69.
- Hille B (Hrsg.) (2001) Ion Channels of Excitable Membranes. Third Edition. *Sinauer Associates, Inc.*, Sunderland, Massachusetts U.S.A.

- Hollmann M and Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* **17**:31-108.
- Hollmann M, O'Shea-Greenfield A, Rogers SW and Heinemann S (1989) Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. *Nature* **342**(6250):643-648.
- Hu B and Zheng F (2005) Molecular determinants of glycine-independent desensitization of NR1/NR2A receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **313**(2):563-569.
- Huang YZ, Pan E, Xiong ZQ, McNamara JO (2008) Zinc-mediated transactivation of TrkB potentiates the hippocampal mossy fiber-CA3 pyramid synapse. *Neuron* **57**(4):546-558.
- Huggins DJ and Grant GH (2005) The function of the amino terminal domain in NMDA receptor modulation. *J Mol Graph Model* **23**(4):381-388.
- Ivanovic A, Reilander H, Laube B and Kuhse J (1998) Expression and initial characterization of a soluble glycine binding domain of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit. *J Biol Chem* **273**(32):19933-19937.
- Johnson JW and Ascher P (1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* **325**(6104):529-531.
- Karadottir R, Cavelier P, Bergersen LH and Attwell D (2005) NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia. *Nature* **438**(7071):1162-1166.
- Katz B and Thesleff S (1957) A study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end-plate. *J Physiol* **138**(1):63-80.
- Kemp JA and McKernan RM (2002) NMDA receptor pathways as drug targets. *Nat Neurosci* **5 Suppl**:1039-1042.
- Kohr G (2006) NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. *Cell Tissue Res* **326**(2):439-446.
- Krupp JJ, Vissel B, Heinemann SF and Westbrook GL (1998) N-terminal domains in the NR2 subunit control desensitization of NMDA receptors. *Neuron* **20**(2):317-327.
- Kunishima N, Shimada Y, Tsuji Y, Sato T, Yamamoto M, Kumasaka T, Nakanishi S, Jingami H and Morikawa K (2000) Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* **407**(6807):971-977.
- Kuryatov A, Laube B, Betz H and Kuhse J (1994) Mutational analysis of the glycine-binding site of the NMDA receptor: structural similarity with bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron* **12**(6):1291-1300.

- Kuusinen A, Abele R, Madden DR and Keinänen K (1999) Oligomerization and ligand-binding properties of the ectodomain of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunit GluRD. *J Biol Chem* **274**(41):28937-28943.
- Lalo U, Pankratov Y, Kirchhoff F, North RA and Verkhratsky A (2006) NMDA receptors mediate neuron-to-glia signaling in mouse cortical astrocytes. *J Neurosci* **26**(10):2673-2683.
- Laube B, Kuhse J and Betz H (1998) Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *J Neurosci* **18**(8):2954-2961.
- Laurie DJ and Seeburg PH (1994) Regional and developmental heterogeneity in splicing of the rat brain NMDAR1 mRNA. *J Neurosci* **14**(5 Pt 2):3180-3194.
- Lee JM, Zipfel GJ and Choi DW (1999) The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature* **399**(6738 Suppl):A7-14.
- Lindsley CW, Shipe WD, Wolkenberg SE, Theberge CR, Williams DL, Jr., Sur C and Kinney GG (2006) Progress towards validating the NMDA receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. *Curr Top Med Chem* **6**(8):771-785.
- Low CM, Zheng F, Lyuboslavsky P and Traynelis SF (2000) Molecular determinants of coordinated proton and zinc inhibition of N-methyl-D-aspartate NR1/NR2A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(20):11062-11067.
- Madden DR (2002) The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat Rev Neurosci* **3**(2):91-101.
- Malenka RC and Nicoll RA (1999) Long-term potentiation--a decade of progress? *Science* **285**(5435):1870-1874.
- Mano I, Lamed Y and Teichberg VI (1996) A venus flytrap mechanism for activation and desensitization of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptors. *J Biol Chem* **271**(26):15299-15302.
- Masuko T, Kashiwagi K, Kuno T, Nguyen ND, Pahk AJ, Fukuchi J, Igarashi K and Williams K (1999) A regulatory domain (R1-R2) in the amino terminus of the N-methyl-D-aspartate receptor: effects of spermine, protons, and ifenprodil, and structural similarity to bacterial leucine/isoleucine/valine binding protein. *Mol Pharmacol* **55**(6):957-969.
- Matsuda K, Fletcher M, Kamiya Y and Yuzaki M (2003) Specific assembly with the NMDA receptor 3B subunit controls surface expression and calcium permeability of NMDA receptors. *J Neurosci* **23**(31):10064-10073.

- Matsuda S, Kamiya Y and Yuzaki M (2005) Roles of the N-terminal domain on the function and quaternary structure of the ionotropic glutamate receptor. *J Biol Chem* **280**(20):20021-20029.
- Mayer ML (2006) Glutamate receptors at atomic resolution. *Nature* **440**(7083):456-462.
- Mayer ML and Westbrook GL (1987) Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *J Physiol* **394**:501-527.
- McBain CJ and Mayer ML (1994) N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. *Physiol Rev* **74**(3):723-760.
- Meddows E, Le Bourdelles B, Grimwood S, Wafford K, Sandhu S, Whiting P and McIlhinney RA (2001) Identification of molecular determinants that are important in the assembly of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* **276**(22):18795-18803.
- Micu I, Jiang Q, Coderre E, Ridsdale A, Zhang L, Woulfe J, Yin X, Trapp BD, McRory JE, Rehak R, Zamponi GW, Wang W and Stys PK (2006) NMDA receptors mediate calcium accumulation in myelin during chemical ischaemia. *Nature* **439**(7079):988-992.
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B and Seeburg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* **12**(3):529-540.
- Mori H and Mishina M (1995) Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology* **34**(10):1219-1237.
- Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Mizuno N and Nakanishi S (1991) Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* **354**(6348):31-37.
- Mott DD, Doherty JJ, Zhang S, Washburn MS, Fendley MJ, Lyuboslavsky P, Traynelis SF and Dingledine R (1998) Phenylethanolamines inhibit NMDA receptors by enhancing proton inhibition. *Nat Neurosci* **1**(8):659-667.
- Mueller HT and Meador-Woodruff JH (2005) Distribution of the NMDA receptor NR3A subunit in the adult pig-tail macaque brain. *J Chem Neuroanat* **29**(3):157-172.
- Nakagawa T, Cheng Y, Ramm E, Sheng M and Walz T (2005) Structure and different conformational states of native AMPA receptor complexes. *Nature* **433**(7025):545-549.
- Nakanishi N, Shneider NA and Axel R (1990) A family of glutamate receptor genes: evidence for the formation of heteromultimeric receptors with distinct channel properties. *Neuron* **5**(5):569-581.

- Nicole O, Docagne F, Ali C, Margaill I, Carmeliet P, MacKenzie ET, Vivien D and Buisson A (2001) The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med* **7**(1):59-64.
- Nishi M, Hinds H, Lu HP, Kawata M and Hayashi Y (2001) Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner. *J Neurosci* **21**(23):RC185.
- Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A and Prochiantz A (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* **307**(5950):462-465.
- O'Hara PJ, Sheppard PO, Thogersen H, Venezia D, Haldeman BA, McGrane V, Houamed KM, Thomsen C, Gilbert TL and Mulvihill ER (1993) The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron* **11**(1):41-52.
- Paoletti P, Ascher P and Neyton J (1997) High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. *J Neurosci* **17**(15):5711-5725.
- Paoletti P and Neyton J (2007) NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* **7**(1):39-47.
- Paoletti P, Perin-Dureau F, Fayyazuddin A, Le Goff A, Callebaut I and Neyton J (2000) Molecular organization of a zinc binding n-terminal modulatory domain in a NMDA receptor subunit. *Neuron* **28**(3):911-925.
- Papadakis M, Hawkins LM and Stephenson FA (2004) Appropriate NR1-NR1 disulfide-linked homodimer formation is requisite for efficient expression of functional, cell surface N-methyl-D-aspartate NR1/NR2 receptors. *J Biol Chem* **279**(15):14703-14712.
- Passafaro M, Nakagawa T, Sala C and Sheng M. (2003) Induction of dendritic spines by an extracellular domain of AMPA receptor subunit GluR2. *Nature* **424**(6949):677-681.
- Pasternack A, Coleman SK, Jouppila A, Mottershead DG, Lindfors M, Pasternack M and Keinanen K (2002) Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor channels lacking the N-terminal domain. *J Biol Chem* **277**(51):49662-49667.
- Perez-Otano I, Schulteis CT, Contractor A, Lipton SA, Trimmer JS, Sucher NJ and Heinemann SF (2001) Assembly with the NR1 subunit is required for surface expression of NR3A-containing NMDA receptors. *J Neurosci* **21**(4):1228-1237.
- Perin-Dureau F, Rachline J, Neyton J and Paoletti P (2002) Mapping the binding site of the neuroprotectant ifenprodil on NMDA receptors. *J Neurosci* **22**(14):5955-5965.

- Rachline J, Perin-Dureau F, Le Goff A, Neyton J and Paoletti P (2005) The micromolar zinc-binding domain on the NMDA receptor subunit NR2B. *J Neurosci* **25**(2):308-317.
- Rosenmund C, Stern-Bach Y and Stevens CF (1998) The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science* **280**(5369):1596-1599.
- Salter MG and Fern R (2005) NMDA receptors are expressed in developing oligodendrocyte processes and mediate injury. *Nature* **438**(7071):1167-1171.
- Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Das S, Cui J, Talantova MV, Wong HK, Gong X, Chan SF, Zhang D, Nakanishi N, Sucher NJ and Lipton SA (2002) Characterization and comparison of the NR3A subunit of the NMDA receptor in recombinant systems and primary cortical neurons. *J Neurophysiol* **87**(4):2052-2063.
- Schipke CG, Ohlemeyer C, Matyash M, Nolte C, Kettenmann H and Kirchhoff F (2001) Astrocytes of the mouse neocortex express functional N-methyl-D-aspartate receptors. *FASEB J* **15**(7):1270-1272.
- Sia GM, Béique JC, Rumbaugh G, Cho R, Worley PF and Huganir RL (2008) Interaction of the N-terminal domain of the AMPA receptor GluR4 subunit with the neuronal pentraxin NP1 mediates GluR4 synaptic recruitment. *Neuron* **55**(1):87-102.
- Stoll L, Hall J, Van Buren N, Hall A, Knight L, Morgan A, Zuger S, Van Deusen H and Gentile L (2007) Differential regulation of ionotropic glutamate receptors. *Biophys J* **92**(4):1343-1349.
- Stys PK and Lipton SA (2007) White matter NMDA receptors: an unexpected new therapeutic target? *Trends Pharmacol Sci* **28**(11):561-566.
- Sucher NJ, Akbarian S, Chi CL, Leclerc CL, Awobuluyi M, Deitcher DL, Wu MK, Yuan JP, Jones EG and Lipton SA (1995) Developmental and regional expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDAR-L) in the rodent brain. *J Neurosci* **15**(10):6509-6520.
- Sun Y, Olson R, Horning M, Armstrong N, Mayer M and Gouaux E (2002) Mechanism of glutamate receptor desensitization. *Nature* **417**(6886):245-253.
- Tong G, Takahashi H, Tu S, Shin Y, Talantova M, Zago W, Xia P, Nie Z, Goetz T, Zhang D, Lipton SA and Nakanishi N (2008) Modulation of NMDA receptor properties and synaptic transmission by the NR3A subunit in mouse hippocampal and cerebrocortical neurons. *J Neurophysiol* **99**(1):122-132.
- Traynelis SF, Burgess MF, Zheng F, Lyuboslavsky P and Powers JL (1998) Control of voltage-independent zinc inhibition of NMDA receptors by the NR1 subunit. *J Neurosci* **18**(16):6163-6175.

-
- Traynelis SF, Hartley M and Heinemann SF (1995) Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. *Science* **268**(5212):873-876.
- Tsai G and Coyle JT (2002) Glutamatergic mechanisms in schizophrenia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**:165-179.
- Verkhratsky A and Kirchhoff F (2007) NMDA Receptors in glia. *Neuroscientist* **13**(1):28-37.
- Watanabe M, Inoue Y, Sakimura K and Mishina M (1993) Distinct spatio-temporal distributions of the NMDA receptor channel subunit mRNAs in the brain. *Ann N Y Acad Sci* **707**:463-466.
- Wollmuth LP and Sobolevsky AI (2004) Structure and gating of the glutamate receptor ion channel. *Trends Neurosci* **27**(6):321-328.
- Yao Y and Mayer ML (2006) Characterization of a soluble ligand binding domain of the NMDA receptor regulatory subunit NR3A. *J Neurosci* **26**(17):4559-4566.
- Yuzaki M (2003) The delta2 glutamate receptor: 10 years later. *Neurosci Res* **46**(1):11-22.
- Zheng F, Erreger K, Low CM, Banke T, Lee CJ, Conn PJ and Traynelis SF (2001) Allosteric interaction between the amino terminal domain and the ligand binding domain of NR2A. *Nat Neurosci* **4**(9):894-901.

6. Originalarbeiten

6.1 Publikation 1

Madry C, Mesic I, Betz H and Laube B (2007) The N-terminal domains of both NR1 and NR2 subunits determine allosteric Zn²⁺ inhibition and glycine affinity of N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol Pharmacol* **72**(6):1535-1544.

6.2 Publikation 2

Schuler T, Mesic I, **Madry C**, Bartholomäus I and Laube B (2008) Formation of NR1/NR2 and NR1/NR3 heterodimers constitutes the initial step in N-methyl-D-aspartate receptor assembly. *J Biol Chem* **283**(1):37-46.

6.3 Publikation 3

Madry C, Mesic I, Bartholomäus I, Nicke A, Betz H and Laube B (2007) Principal role of NR3 subunits in NR1/NR3 excitatory glycine receptor function. *Biochem Biophys Res Commun* **354**(1):102-108.

6.4 Publikation 4

Madry C, Betz H, Geiger JRP and Laube B (2008) Supralinear potentiation of NR1/NR3A excitatory glycine receptors by Zn²⁺ and NR1 antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(34):12563-12568

The N-Terminal Domains of both NR1 and NR2 Subunits Determine Allosteric Zn^{2+} Inhibition and Glycine Affinity of *N*-Methyl-D-aspartate Receptors

Christian Madry, Ivana Mesic, Heinrich Betz, and Bodo Laube

Abteilung Neurochemie, Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Frankfurt am Main, Germany (C.M., I.M., H.B., B.L.); and AG Molekulare und Zelluläre Neurophysiologie, Technische Universität Darmstadt, Darmstadt, Germany (I.M., B.L.)

Received July 16, 2007; accepted September 17, 2007

ABSTRACT

The *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) subtype of ionotropic glutamate receptors (iGluRs) is a tetrameric protein composed of homologous NR1 and NR2 subunits, which require the binding of glycine and glutamate, respectively, for efficient channel gating. The extracellular N-terminal domains (NTDs) of iGluR subunits show sequence homology to the bacterial periplasmic leucine/isoleucine/valine binding protein (LIVBP) and have been implicated in iGluR assembly, trafficking, and function. Here, we investigated how deletion of the NR1- and NR2-NTDs affects the expression and function of NMDA receptors. Both proteolytic cleavage of the NR1-NTD from assembled NR1/NR2 receptors and coexpression of the NTD-deleted NR1 subunit with wild-type or NTD-deleted NR2 subunits resulted in agonist-gated channels that closely resembled wild-type re-

ceptors. This indicates that the NTDs of both NMDA receptor subunits are not essential for receptor assembly and function. However, deletion of either the NR1 or the NR2 NTD eliminated high-affinity, allosteric inhibition of agonist-induced currents by Zn^{2+} and ifenprodil, consistent with the idea that interdomain interactions between these domains are important for allosteric receptor modulation. Furthermore, by replacing the NR2A-NTD with the NR2B NTD, and vice versa, the different glycine affinities of NR1/NR2A and NR1/NR2B receptors were found to be determined by their respective NR2-NTDs. Together, these data show that the NTDs of both the NR1 and NR2 subunits determine allosteric inhibition and glycine potency but are not required for NMDA receptor assembly.

Excitatory neurotransmission in the mammalian brain is mainly mediated by ionotropic glutamate receptors (iGluRs). Based on pharmacological studies, iGluRs have been grouped into three distinct subfamilies: AMPA receptors (GluR1–4), kainate receptors (GluR5–7, KA1, 2), and NMDA receptors (NR1, NR2A-D, NR3A, B) (overview in Dingledine et al., 1999; Cull-Candy et al., 2001). All iGluR subunits share a common modular design characterized by 1) an extracellular N-terminal domain (NTD) of approximately 400 amino acids that shows sequence homology to the bacterial periplasmic leucine/isoleucine/valine binding protein (LIVBP) and has

been implicated in iGluR subunit oligomerization, trafficking, and function; 2) a S1S2 ligand binding domain (LBD) composed of an extracellular region preceding the first transmembrane domain and a second extracellular region connecting the transmembrane segments 2 and 3; 3) a membrane re-entrant loop domain located between transmembrane segments 1 and 2, which lines the ion channel; and 4) an intracellular carboxyterminal tail region that interacts with postsynaptic scaffolding and signal transduction proteins (reviewed in Madden, 2002).

Among iGluRs, NMDA receptors stand out with respect to both their molecular diversity and their particular pharmacological and functional properties (Dingledine et al., 1999). Within the heterotetrameric receptor proteins, various splice variants of the glycine-binding NR1 subunit (Kuryatov et al., 1994) coassemble with glutamate-binding NR2 (Laube et al., 1997) and/or glycine-binding NR3 subunits (Yao and Mayer, 2006). Activation of NMDA receptors is a complex process

This study was supported by the Max-Planck-Gesellschaft (H.B.), Gemeinnützige Hertie-Stiftung (B.L.), Dr. Robert Pflieger Stiftung (B.L.), Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant LA 1086/4-1, B.L.), and Fonds der Chemischen Industrie (H.B.). C.M. received a predoctoral fellowship from the Graduiertenkolleg Neuronale Plastizität, University of Frankfurt.

Article, publication date, and citation information can be found at <http://molpharm.aspetjournals.org>.
doi:10.1124/mol.107.040071.

ABBREVIATIONS: iGluR, ionotropic glutamate receptor; AMPA, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid; NMDA, *N*-methyl-D-aspartic acid; NTD, N-terminal domain; LIVBP, leucine/isoleucine/valine binding protein; LBD, ligand binding domain; HEK, human embryonic kidney; ifenprodil, 4-[2-[4-(cyclohexylmethyl)-1-piperidinyl]-1-hydroxypropyl]phenol; MK801, (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5*H*-dibenzo[*a,d*]cyclohepten-5,10-imine maleate; MDL-29951, 3-(2-carboxyethyl)-4,6-dichloro-1*H*-indole-2-carboxylic acid; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; EGFP, enhanced green fluorescent protein; TCS, thrombin cleavage site; wt, wild-type; t-PA, tissue-type plasminogen activator.

that requires ambient glycine and release of glutamate from presynaptic terminals in coincidence with postsynaptic membrane depolarization, which relieves the receptor channel from a voltage-dependent block by Mg^{2+} ions. NMDA receptor function is regulated by allosteric inhibitors, such as Zn^{2+} and the phenylethanolamine ifenprodil, which bind to the NTDs of NR2A and NR2B subunits (Herin and Aizenman, 2004) and enhance receptor desensitization (Krupp et al., 1998; Zheng et al., 2001). The molecular basis of allosteric NMDA receptor inhibition is poorly understood but has been attributed to interactions between the NTD and the LBD of the NR2 subunits (Paoletti et al., 2000). Deletion of the NR2A and NR2B NTDs generates NMDA receptors that display a reduced inhibition by both Zn^{2+} and ifenprodil (Paoletti et al., 2000). The role of the NR1-NTD has not been investigated further, because N-terminal truncations within the NR1 subunits have been reported to impair receptor function upon coexpression with NR2 subunits (Meddows et al., 2001).

Here, we analyzed the role of the NTD of the NR1 subunit in NMDA receptor assembly and allosteric inhibition by both enzymatically cleaving this domain from properly assembled receptors and coexpressing a truncated NR1 subunit with wild-type or NTD-deleted NR2A and NR2B subunits. We find that, like the NR2-NTDs, the NR1-NTD is not required for receptor function and assembly but notably contributes to allosteric Zn^{2+} and ifenprodil inhibition. In addition, high-affinity glycine binding requires the NTDs of both NR1 and NR2B subunits. Our data suggest that direct interactions between the NR1 and NR2 NTDs determine the potency of allosteric inhibitors and the coagonist glycine.

Materials and Methods

MK801, D-(−)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid, and MDL-29951 were purchased from Tocris (Biotrend, Cologne, Germany). All other chemicals used were obtained from Sigma (Taufkirchen, Germany).

DNA Constructs, Oocyte Expression, and Electrophysiology. cDNAs of the NR1a, NR2A, and NR2B subunits were subcloned into the pNKS2 vector. Mutations were introduced by site-directed mutagenesis (QuikChange XL site-directed mutagenesis kit; Stratagene, Amsterdam, The Netherlands) and confirmed by DNA sequencing. The NR1^{ΔNTD} construct was generated by excising the nucleotide sequence encoding amino acids 5 to 358 of the mature protein with the use of PvuI. To enzymatically remove the NTD of NR1, a thrombin recognition sequence (LVPRGS) (Madry et al., 2007) was inserted at position 358 of the NR1 subunit that had been fused to enhanced green fluorescent protein (EGFP-NR1^{TCS}) by subcloning into the pEGFP-C1 vector (Clontech, Mountain View, CA). The NR2A^{ΔNTD}, NR2B^{ΔNTD}, NR2A^{NTD2B}, and NR2B^{NTD2A} constructs (Paoletti et al., 2000; Rachline et al., 2005) were kindly provided by Dr. P. Paoletti (Ecole Normale Supérieure, Paris, France). The NR2A*-His construct was generated by replacing the C-terminal region from amino acid 930 with a 6× His tag (Madry et al., 2007). In vitro synthesis of cRNA (mCAP mRNA Capping Kit; Ambion, Austin, TX) was performed as described previously (Madry et al., 2007). For heterologous expression of NMDA receptors, 25 ng of cRNA was injected at a NR1:NR2 ratio of 1:2 into *Xenopus laevis* oocytes. Oocytes were isolated and maintained as described previously (Laube et al., 1997). Two-electrode voltage-clamp recording of whole-cell currents was performed according to Laube et al. (1995). To monitor the voltage dependence of NR1/NR2B NTD-deleted receptor combinations, 2-s −80/+40 mV voltage ramps were used. Leakage currents were recorded before agonist/ Zn^{2+} application and subtracted from the agonist/ Zn^{2+} -induced currents. To measure desensitization of receptor responses, we recorded currents upon applica-

tion of saturating concentrations of glycine and glutamate (100 μ M, each) until a steady-state plateau was reached. Based on steady-state (I_{ss}) and peak (I_p) current amplitudes recorded in the same solution, we calculated the extent of desensitization as the percentage (%) of current decay in the continuous presence of the agonists. For thrombin treatment, oocytes were incubated with 30 U/ml protease for 60 min at room temperature. Same oocytes were measured before and after thrombin exposure.

Transfection of HEK293 Cells and Thrombin Treatment. Culture conditions for human embryonic kidney (HEK) 293 cells (American Type Culture Collection, Manassas, VA) have been described previously (Laube et al., 1995). Transfection with Lipofectamine 2000 was performed according to the manufacturer's protocol (Invitrogen, Carlsbad, CA). HEK293 cells were cotransfected with either EGFP-NR1 (wt) or EGFP-NR1^{TCS} plasmid together with the NR2A construct, using 20 μ g of total DNA at a NR1/NR2 ratio of 1:3. Transfected cells were cultured in the presence of the NMDA inhibitors MK801, D-(−)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid, and MDL-29951 (all 100 μ M) for 48 h. Then new medium without Ca^{2+} and bovine serum albumin was added, and the cells were incubated with 30 U/ml thrombin for 30 min at 37°C followed by harvesting and homogenization in a Polytron homogenizer (Kinematica, Basel, Switzerland). After centrifugation at 1000g, the supernatant was centrifuged at 10,000g for 20 min at 4°C to obtain the membrane pellet, which then was suspended in SDS sample buffer.

Metabolic Labeling, Purification, and SDS-PAGE of NMDA Receptor Complexes. Injected oocytes were metabolically labeled by overnight incubation with [³⁵S]methionine as described previously (Madry et al., 2007). After an additional 24-h chase interval, labeled receptor complexes were purified by nickel-nitrilotriacetic acid chromatography from 0.5% (w/v) dodecylmaltoside extracts of the labeled oocytes as detailed previously (Sadtler et al., 2003). For SDS-PAGE, protein samples were solubilized in SDS sample buffer containing 20 mM dithiothreitol and electrophoresed in parallel with molecular mass markers (Precision Plus Protein All Blue Standard; Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany) on 10% Tricine/SDS-polyacrylamide gels. Radioactive gels were dried and exposed to BioMax MR films (Kodak, Stuttgart, Germany) at 80°C or to a phosphor-imaging plate for quantification purposes. Phosphor plates were scanned on a Typhoon Trio fluorescence scanner and analyzed with Image Quant TL software (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Buckinghamshire, UK).

Antibodies. Anti-NR1 (generated against amino acids 660–811 of the rat NR1 subunit) and anti-EGFP primary antibodies were purchased from BD Biosciences (Heidelberg, Germany) and used at dilutions of 1:500 (NR1) and 1:1000 (EGFP), respectively. Goat anti-mouse horseradish peroxidase-linked secondary antibody (Dianova, Hamburg, Germany) was employed at a final dilution of 1:10,000, and immunoreactive bands were detected with the ECL Western blotting system (GE Healthcare, Munich, Germany).

Statistical Analyses. Values given represent means \pm S.E. Statistical significance was determined at the $p < 0.01$ (*) and $p < 0.001$ (**) levels using a Student's two-tailed, unpaired t test.

Results

To investigate the role of the NTD of the glycine-binding NR1 subunit in NMDA receptor assembly and function, we designed two different NR1 cDNA constructs. First, by inserting a thrombin cleavage site (TCS) sequence at amino acid position 358 of the NR1 subunit (EGFP-NR1^{TCS}; Fig. 1A), we generated a NR1 subunit, which should allow proteolytic cleavage of the NR1-NTD from surface-located receptors upon thrombin treatment. Visualization and immunological detection of the respective NR1-NTD fragment was achieved by an N-terminal EGFP tag (see Fig. 1A, and *Materials and Methods*). Second, a truncated NR1 subunit

(NR1^{ΔNTD}; Fig. 1A) was generated by deleting the nucleotide sequence encoding residues 5 to 358.

Biochemical and Functional Characterization of NMDA Receptors Containing the Thrombin-Cleavable EGFP-NR1^{TCS} Subunit. To examine whether the NR1^{TCS} construct is cleaved by thrombin, we coexpressed both the EGFP-NR1 and the EGFP-NR1^{TCS} subunits with the NR2A subunit in HEK 293 cells. Western blot analysis of membrane fractions prepared from the transfected cells revealed a single band of apparent molecular mass of approximately 130 kDa with both the wild-type (wt) EGFP-NR1 and the EGFP-NR1^{TCS} DNAs upon staining with an anti-EGFP antibody (Fig. 1B, lanes 1 and 2). Upon thrombin treatment of the intact cells, membranes prepared from wt EGFP-NR1 and NR2A transfected cells again contained a 130-kDa NR1

protein band that was recognized by both anti-NR1 and anti-EGFP antibodies (Fig. 1B, lanes 3 and 4). In contrast, treatment of EGFP-NR1^{TCS} and NR2A subunit-expressing cells with thrombin generated, in addition to the 130-kDa band, two prominent fragments of approximately 60 and 70 kDa that were stained by anti-NR1 and anti-EGFP, respectively (Fig. 1B, lanes 5 and 6). These fragment sizes are consistent with the calculated masses of the membrane-bound “core” NR1 subunit and the truncated EGFP-tagged NTD of the EGFP-NR1^{TCS} subunit (Fig. 1A). This indicates an efficient cleavage of surface-located EGFP-NR1^{TCS}/NR2A receptors, whereas the noncleaved NR1^{TCS} 130-kDa protein most likely corresponds to thrombin-inaccessible intracellularly located subunits. Furthermore, copurification of the truncated EGFP-tagged NTD in the membrane fraction shows that cleavage of the NR1-NTD by thrombin does not necessarily result in a separation of this domain from the “core” receptor, implying strong noncovalent interactions with the remaining protein.

The consequences of thrombin-mediated cleavage of the NR1-NTD on apparent agonist affinities and maximal inducible currents (I_{\max}) were analyzed by two-electrode voltage clamping after coexpression of EGFP-NR1^{TCS} with the NR2B subunit in *Xenopus laevis* oocytes. The resulting glycine and glutamate dose-response curves were indistinguishable to those of the wt NR1/NR2B receptor in the absence and presence of thrombin. In contrast, after thrombin treatment, the EC_{50} value of the EGFP-NR1^{TCS}/NR2B receptor showed a significant decrease in apparent glycine affinity (0.30 ± 0.04 versus $0.80 \pm 0.14 \mu\text{M}$; $p < 0.01$, $n = 4$), whereas the glutamate EC_{50} value (1.2 ± 0.4 versus $1.3 \pm 0.3 \mu\text{M}$) and the maximal inducible currents were not significantly changed (Fig. 2A, left). Because a similar result was also obtained for EGFP-NR1^{TCS}/NR2A receptors (Fig. 2B, left), we conclude that thrombin-mediated cleavage of the NR1 NTD does not impair receptor function.

Cleavage of the NR1-NTD Eliminated High-Affinity Zn^{2+} Inhibition of NR1/NR2 Receptors. Because the NTDs of the NR2 subunits have been found to mediate the allosteric inhibition of NMDA receptors (overview in Herin and Aizenman, 2004), we also examined the effect of thrombin-mediated NR1-NTD deletion on Zn^{2+} inhibition of both EGFP-NR1^{TCS}/NR2B and EGFP-NR1^{TCS}/NR2A receptor currents. NR2B-containing NMDA receptors are inhibited by micromolar concentrations of Zn^{2+} (Rachline et al., 2005). Upon thrombin treatment of oocytes expressing the EGFP-NR1^{TCS}/NR2B combination, the IC_{50} value of Zn^{2+} increased 19-fold, from $13 \pm 3 \mu\text{M}$ before to $256 \pm 34 \mu\text{M}$ after incubation with the protease ($p < 0.01$, $n = 3$; Fig. 2A, right). This suggested that the NTD of the NR1 subunit is not essential for receptor function but contributes to allosteric Zn^{2+} inhibition.

To examine whether the NR1-NTD is also required for the biphasic mode of Zn^{2+} inhibition seen with NR1/NR2A receptors (Williams, 1996; Paoletti et al., 1997), we determined the effects of Zn^{2+} on agonist-induced currents of EGFP-NR1^{TCS}/NR2A-expressing oocytes before and after thrombin treatment (Fig. 2B). Recordings from untreated oocytes disclosed the typical biphasic Zn^{2+} inhibition curve with IC_{50} values of 0.028 ± 0.005 and $75 \pm 8 \mu\text{M}$ for the high- and low-affinity Zn^{2+} -binding sites, respectively ($n = 5$). After a 1-h incubation with thrombin, the high-affinity component of

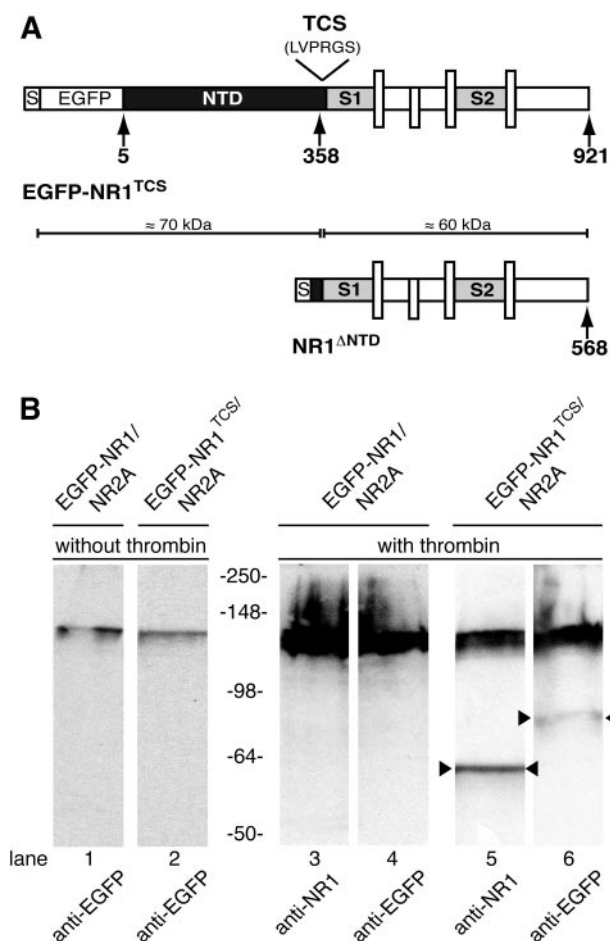


Fig. 1. Biochemical characterization of a thrombin-cleavable NR1^{TCS} subunit. A, schematic representations of 1) an NR1 construct harboring a thrombin cleavage site (LVPRGS) at amino acid position 358 and an N-terminal EGFP-tag (EGFP-NR1^{TCS}, top) and 2) an NTD-deleted NR1 subunit lacking amino acids 5–358 (NR1^{ΔNTD}, bottom). S, signal peptide (18 amino acids); S1S2, glycine binding domains. Hydrophobic intramembrane regions are indicated as vertical boxes. Amino acid numbering starts with the first amino acid of the mature protein. B, left, Western blot analysis of wt EGFP-NR1 and EGFP-NR1^{TCS} proteins generated upon coexpression with the NR2A subunit in HEK 293 cells. A single band of approximately 130-kDa molecular mass is detected using the anti-EGFP antibody (lanes 1 and 2). Right, thrombin treatment of EGFP-NR1^{TCS}-expressing HEK 293 cells for 30 min resulted in the appearance of 70-kDa N-terminal and 60-kDa C-terminal fragments that reacted with the anti-EGFP and anti-NR1 antibodies, respectively (lanes 5 and 6). In contrast, the wt EGFP-NR1 subunit was not cleaved by thrombin under the same conditions (lanes 3 and 4).

Zn^{2+} inhibition was reduced by >80%, with low-affinity Zn^{2+} inhibition predominating ($259 \pm 64 \mu\text{M}$, $n = 5$; Fig. 2B right). In conclusion, thrombin efficiently cleaves surface-localized EGFP-NR1^{TCS} subunits and thereby strongly reduces the affinity of Zn^{2+} inhibition at both NR1/NR2A and NR1/NR2B receptors.

N-Terminally Truncated NR1 Subunits Assembled Efficiently into Functional NMDA Receptors. To investigate the importance of the NR1-NTD for receptor assembly, we examined whether an N-terminally truncated NR1 subunit that lacks amino acids 5 to 358 of the mature NR1 subunit (NR1^{ΔNTD}, Fig. 1A) forms heteromeric NMDA receptors after heterologous expression in *X. laevis* oocytes. To this end, we coexpressed the wt and the NR1^{ΔNTD} construct with the tagged NR2A*-His subunit (Madry et al., 2007) in oocytes that were metabolically labeled with [³⁵S]methionine. The NR2A*-His subunit was then purified under nondenaturing conditions by metal affinity chromatography from digitonin extracts of the oocytes and analyzed by reducing SDS-PAGE and autoradiography (Sadtlir et al., 2003). Figure 3A, lane 1, shows that two ³⁵S-labeled bands with apparent molecular masses of approximately 116 and 105 kDa corresponding to those of the NR1 and NR2A*-His subunits, respectively, were coisolated by this protocol. Likewise, coexpression of the NR1^{ΔNTD} with the NR2A*-His construct resulted in coisolation of two ³⁵S-labeled bands with molecular masses of approximately 78 and 105 kDa, showing that the NR1^{ΔNTD} subunit also assembles with NR2A*-His (Fig. 3A, lane 2). Quantification of the subunit bands by PhosphorImaging revealed a ratio of ³⁵S-radioactivities of the wt NR1 subunit to the NR2A*-His polypeptide of 1.09 ± 0.16 ($n = 3$). This value is in good agreement with the theoretical ratio of 0.93, calculated from the determined subunit stoichiometry of 2NR1:2NR2 (Laube et al., 1998) and the known numbers of 28 and 30 methionine residues per mature NR1 and NR2A*-His subunit, respectively. Analysis of NR1^{ΔNTD}/NR2A*-His receptors yielded a ratio of 0.60 ± 0.09 ($n = 3$) of NR1^{ΔNTD} to NR2A* subunit radioactivities. This is consistent with a lower number (18) of methionine residues in NR1^{ΔNTD}, which

predicts a theoretical ratio of 0.60 for a receptor complex containing two NR1^{ΔNTD} and two NR2A*-His subunits. Because the intensities of the NR2A*-His polypeptide bands were not different in the affinity-purified NR1/NR2A*-His and NR1^{ΔNTD}/NR2A*-His receptors, the values obtained for both preparations, at the close-to-theoretical NR1/NR2A ratio of 1:1, indicate that 1) both the wt NR1 and NR1^{ΔNTD} subunits assemble at a 2:2 stoichiometry with NR2A*-His, and 2) both NR1 polypeptides show comparable assembly efficiencies. In conclusion, NMDA receptor formation seems not to depend on the NTD of the NR1 subunit.

NTD-Deleted NR1 and NR2 Subunits Generated Functional NMDA Receptors. A previous study has shown that coexpression of NTD-deleted NR2A and NR2B subunits with wt NR1 generates functional NMDA receptors (Paoletti et al., 2000). To analyze whether the NTD deleted NR1 subunit NR1^{ΔNTD} assembles into functional receptors upon coexpression with the NR2A or NR2B subunit, we applied saturating glutamate and glycine concentrations (100 μM each) to recombinant NR1/NR2B, NR1^{ΔNTD}/NR2B, NR1/NR2B^{ΔNTD}, and NR1^{ΔNTD}/NR2B^{ΔNTD} receptors. All subunit combinations mentioned above were found to produce robust currents with I_{max} values that were not significantly different from each other (Fig. 3B; Tables 1 and 2). Likewise, receptors composed of NTD-deleted NR1 and NR2A subunits displayed robust agonist responses in the presence of saturating agonist concentrations, with I_{max} values similar to those of wt NR1/NR2A receptors (Table 1). Furthermore, we determined the extent of current decay of NR1/NR2A-, NR1/NR2B-, NR1^{ΔNTD}/NR2A^{ΔNTD}-, and NR1^{ΔNTD}/NR2B^{ΔNTD}-expressing oocytes in the continuous presence of saturating glycine and glutamate concentrations (100 μM each) by measuring the ratio of the peak (I_p) and steady-state (I_{ss}) current as an estimate for receptor desensitization. Figure 3C, left, shows typical traces recorded from wt NR1/NR2A and mutant NR1^{ΔNTD}/NR2A^{ΔNTD} receptors, which rapidly reached peak amplitude and then strongly decayed to steady-state currents in the presence of agonists. For wt NR1/NR2A channels, the

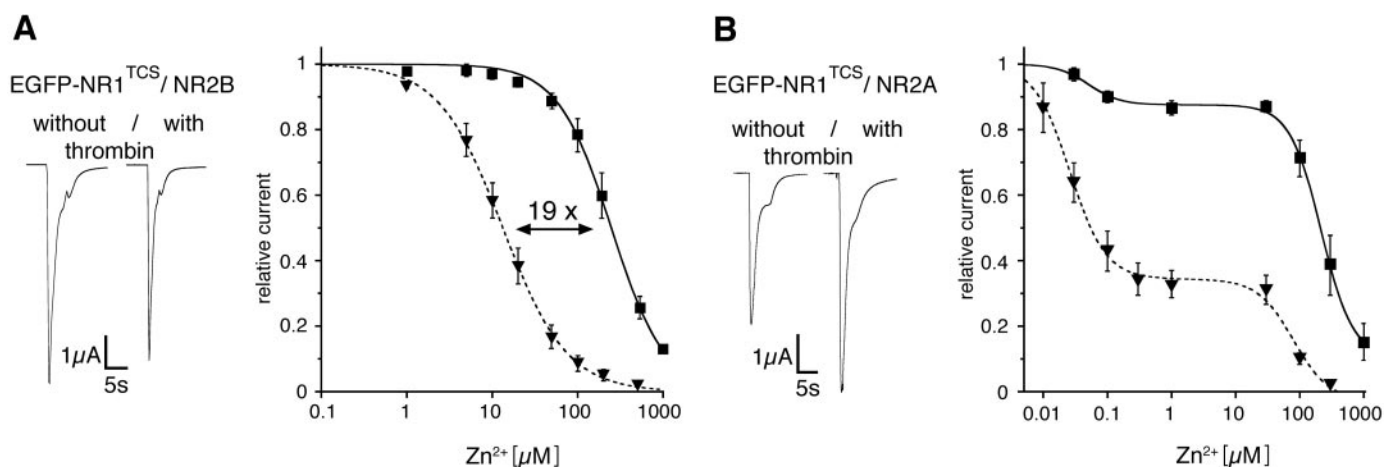


Fig. 2. Functional characterization of NR1^{TCS}/NR2A and NR1^{TCS}/NR2B receptors before and after thrombin cleavage. Dose-response analysis of receptors formed by the EGFP-NR1^{TCS} subunit upon coexpression with either the NR2B (A) or the NR2A (B) subunits in *X. laevis* oocytes before (▼, broken line) and after (■, full line) thrombin treatment by two-electrode voltage clamping. Left, comparison of agonist-induced currents of EGFP-NR1^{TCS}/NR2A and -NR2B-expressing cells elicited by application of glutamate and glycine (100 μM , each) before and after a 1-h exposure to thrombin. Right, Zn^{2+} inhibition curves determined before and after thrombin cleavage revealed an approximately 19-fold reduction in the apparent Zn^{2+} affinity of EGFP-NR1^{TCS}/NR2B (A) receptors and an almost complete loss of high-affinity Zn^{2+} inhibition for EGFP-NR1^{TCS}/NR2A (B) receptors upon proteolytic cleavage of the NR1 NTD.

extent of desensitization expressed as a percentage of the peak current was $83 \pm 2.4\%$ ($n = 13$), whereas mutant receptors showed a significantly decreased extent of desensitization ($51 \pm 1.3\%$; $n = 13$) (Fig. 3D). Analysis of wt NR1/NR2B and mutant NR1^{ΔNTD}/NR2B^{ΔNTD} receptors revealed no differences in the desensitization ratios with values of 54 ± 1.2 and $54 \pm 5.5\%$ ($n = 13$), respectively (Fig. 3, C, right traces, and D). Overall, these data clearly

show that the NTDs of the NR1 and NR2 subunits are not required for NMDA receptor assembly and membrane insertion but may play a role in determining receptor-kinetics.

The NR1-NTD Was Required for High-Affinity Zn²⁺ Inhibition of NR1/NR2A Receptors. The NTD of the NR2A subunit is known to harbor crucial determinants of the voltage-independent, high-affinity inhibition by Zn²⁺ (Choi and Lipton, 1999; Fayyazuddin et al., 2000; Paoletti et al.,

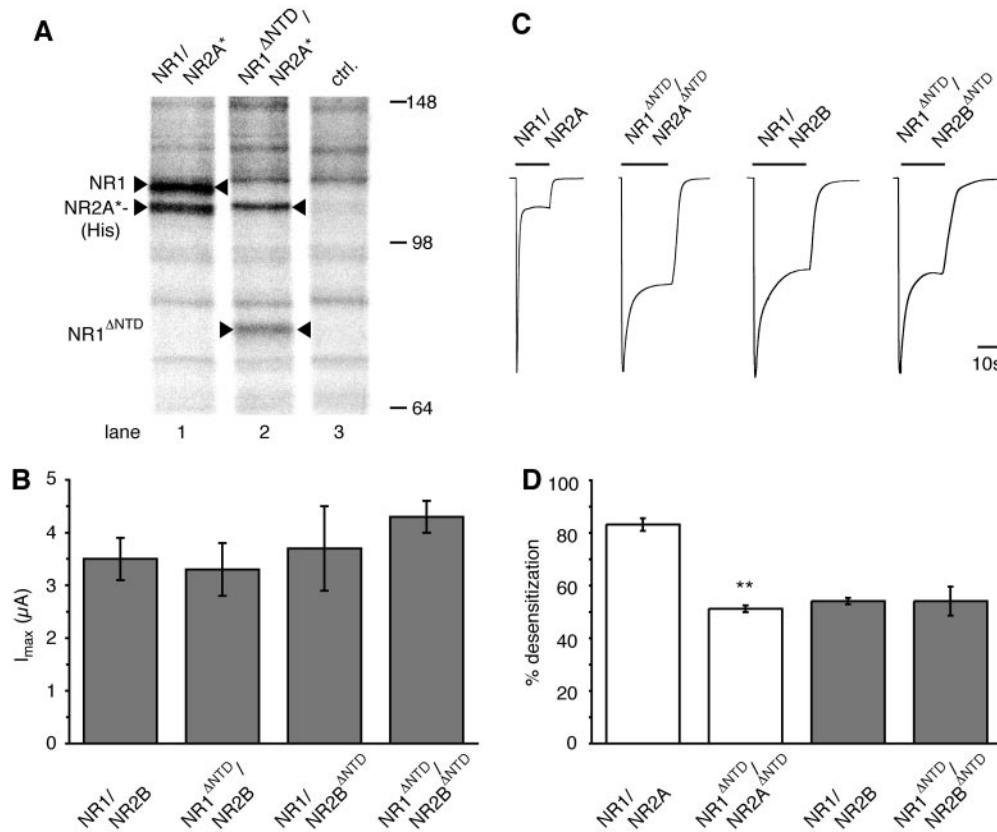


Fig. 3. Assembly and functional properties of NMDA receptors containing NTD-deleted NR1 and/or NR2 subunits. **A**, the NR1^{ΔNTD} subunit forms hetero-oligomers with the NR2A subunit. *X. laevis* oocytes coexpressing a His-tagged NR2A* with nontagged NR1 or NR1^{ΔNTD} subunits were metabolically labeled with [³⁵S]methionine, and the receptor complexes formed were isolated by affinity purification and analyzed by SDS-PAGE. Lane 1 shows two bands with apparent molecular masses of approximately 116 and 105 kDa, which represent the coisolated wt NR1 and NR2A*-His subunits. Coexpression of the NR1^{ΔNTD} with the NR2A*-His construct similarly resulted in coisolation of two [³⁵S]-labeled bands with molecular masses of approximately 78 and 105 kDa, which correspond to the NR1^{ΔNTD} and NR2A*-His subunits (lane 2). Lane 3, isolate from noninjected oocytes. **B**, quantitative analysis of wt NR1/NR2B-, NR1^{ΔNTD}/NR2B-, NR1/NR2B^{ΔNTD}-, and NR1^{ΔNTD}/NR2B^{ΔNTD}-expressing oocytes showed no significant differences in the mean maximal agonist-inducible whole-cell currents (1 s application of 100 μM glutamate and glycine, each) compared with wt NR1/NR2B receptors (Table 2). **C**, examples of current traces showing the extent of desensitization of NR1/NR2A, NR1^{ΔNTD}/NR2A^{ΔNTD}, NR1/NR2B, and NR1^{ΔNTD}/NR2B^{ΔNTD} receptor combinations to sustained application of glutamate and glycine (100 μM, each). **D**, relative ratios of steady-state (I_{ss}) versus peak (I_p) currents of NR1/NR2A, NR1/NR2B, NR1^{ΔNTD}/NR2A^{ΔNTD}, and NR1^{ΔNTD}/NR2B^{ΔNTD} receptors. Note a significant decrease in the extent of receptor desensitization (%) for the NR1^{ΔNTD}/NR2A^{ΔNTD} combination compared with wt.

TABLE 1

Pharmacology of NMDA receptors assembled from wt and NTD-deleted NR1/NR2A subunits

Glycine and glutamate EC₅₀ values were determined in the presence of 100 μM glutamate or glycine, respectively. IC₅₀ values of Zn²⁺ were obtained by preincubating the cells with the allosteric inhibitor followed by coapplying the inhibitor with 100 μM each glutamate and glycine. cRNAs were injected at a NR1/NR2 ratio of 1:2, and recordings were performed after 2 to 3 days of expression. Values represent means ± S.E. Number of experiments was between 5 and 21.

Subunit Composition	I _{max}	EC ₅₀		IC ₅₀ Zn ²⁺	
		Glutamate	Glycine	High Affinity	Low Affinity
	μA				
NR1/NR2A	5.4 ± 0.3	2.6 ± 0.4	1.7 ± 0.2	0.012 ± 0.004	225 ± 19
NR1 ^{ΔNTD} /NR2A	8.5 ± 1.0	1.7 ± 0.3	1.8 ± 0.2	N.D.	305 ± 79
NR1/NR2A ^{ΔNTD}	5.0 ± 1.9	3.6 ± 0.7	2.1 ± 0.4	N.D.	319 ± 99
NR1 ^{ΔNTD} /NR2A ^{ΔNTD}	6.4 ± 0.8	4.6 ± 1.1	2.7 ± 0.5	N.D.	302 ± 61

N.D., not detectable.

2000). Recordings of wt NR1/NR2A receptors exhibited a biphasic Zn^{2+} inhibition-response curve, with IC_{50} values in the nanomolar and micromolar ranges (Table 1) and a maximal inhibition of approximately 60% exerted via the high-affinity site (Fig. 4A). To examine whether coassembly with the NR1 $^{\Delta NTD}$ construct would result in a similar reduction of Zn^{2+} inhibition as seen upon thrombin treatment of NR1 TCS /NR2A receptors, we coexpressed different combinations of wt and NTD-deleted NR1 and NR2A subunits. With the NR1 $^{\Delta NTD}$ /NR2A, NR1/NR2A $^{\Delta NTD}$, and NR1 $^{\Delta NTD}$ /NR2A $^{\Delta NTD}$ combinations, we found a complete loss of high-affinity Zn^{2+} inhibition; only a low-affinity inhibitory component persisted at all these truncated receptors (Fig. 4A, Table 1). Thus, not only the NR2A-NTD but also the NR1-NTD are crucially required for high-affinity Zn^{2+} inhibition of NR1/NR2A receptors.

Both NR1- and NR2B-NTDs Contributed to Zn^{2+} and Ifenprodil Inhibition. To unravel possible roles of the NTDs also in NR1/NR2B receptor modulation, we first analyzed the effects of Zn^{2+} on all possible combinations of wt and NTD-deleted NR1 and NR2B subunits (i.e., NR1/NR2B, NR1 $^{\Delta NTD}$ /NR2B, NR1/NR2B $^{\Delta NTD}$, and NR1 $^{\Delta NTD}$ /NR2B $^{\Delta NTD}$). Analysis of the respective inhibition curves revealed significant differences in Zn^{2+} sensitivity (Table 2). Both single and double deletions of the NTDs of the NR1 and/or NR2B subunits markedly increased to a similar extent the concentration of Zn^{2+} required to half-maximally inhibit NR1/NR2B receptors (Fig. 4B; Table 2). We furthermore examined the role of the NTDs for inhibition by the synthetic neuroprotective compound ifenprodil, which has been reported to allosterically inhibit NMDA receptors via the NTD of the NR2B subunit (Perin-Dureau et al., 2002). At wt NR1/NR2B receptors, ifenprodil displayed an IC_{50} value of $0.89 \pm 0.08 \mu M$ (Fig. 4C). Again, single as well as double deletions of the NTDs of NR1 and NR2B subunits caused a >100-fold reduction in inhibitory potency (Fig. 4C, Table 2). Overall, our data emphasize the importance of both the NR1- and NR2-NTDs for high-affinity allosteric Zn^{2+} and ifenprodil inhibition of NR1/NR2A and NR1/NR2B receptors.

Residual Zn^{2+} and Ifenprodil Inhibition of NTD-Deleted Receptors Was Mediated by Both Voltage-Dependent and -Independent Low-Affinity Components. To reveal whether the residual low-affinity Zn^{2+} - and ifenprodil inhibition seen with NTD-deleted NR1/NR2B receptors (see Table 2) is mediated by either a channel-blocking effect or a voltage-independent low-affinity site, we analyzed the current-voltage relationship of agonist currents recorded in the presence of Zn^{2+} . Whereas in Mg^{2+} -free medium, the current-voltage relation of wt NR1/NR2B receptors was

linear in the presence of $10 \mu M Zn^{2+}$ (Fig. 5A), the inhibition of NTD-deleted NR1 $^{\Delta NTD}$ /NR2B, NR1/NR2B $^{\Delta NTD}$, and NR1 $^{\Delta NTD}$ /NR2B $^{\Delta NTD}$ receptors seen in the presence of $100 \mu M Zn^{2+}$ was found to be composed of a voltage-dependent and -independent component (Fig. 5, B–D). The latter, detected at positive holding potentials, is likely mediated via a separate Zn^{2+} binding site located within domains distinct from the NTDs (see Fayyazuddin et al., 2000; Rachline et al., 2005). Similar to Zn^{2+} inhibition, the remaining ifenprodil effect observed with the NTD-deleted receptors displayed voltage dependence at negative holding potentials (not shown). We therefore conclude that, besides a voltage-dependent channel block, NR1/NR2A and NR1/NR2B receptors harbor a common voltage-independent Zn^{2+} -binding site outside the NTDs responsible for voltage-independent low-affinity Zn^{2+} inhibition.

Removal of NR1- and/or NR2B-NTDs Reduced Glycine Affinity. We initially observed that thrombin cleavage of EGFP-NR1 TCS /NR2B receptors reduced not only their Zn^{2+} sensitivity but also increased the EC_{50} value of glycine (0.30 ± 0.04 versus $0.80 \pm 0.14 \mu M$). This prompted us to determine the apparent glutamate and glycine affinities of NTD-deleted NR1/NR2A and NR1/NR2B receptors. In agreement with previous studies (Laurie and Seeburg, 1994; Priestley et al., 1995), the glycine affinities of NR1/NR2A and NR1/NR2B receptors were found to be significantly different (Fig. 6A), with EC_{50} values of 1.7 ± 0.2 versus $0.39 \pm 0.04 \mu M$, respectively ($p < 0.001$; Tables 1 and 2). We saw significant changes in glycine EC_{50} values only with NTD-deleted NR1/NR2B receptor combinations (Fig. 6B, Tables 1 and 2), whereas the glycine affinity of NR2A-containing receptors remained unaltered upon NTD removal (Fig. 6B, Table 1). No changes in glutamate affinities were obtained for either NR1/NR2A or NR1/NR2B receptors after NTD-deletion (Tables 1 and 2). Hence, both the NR1- and the NR2B-NTDs are essential for high-affinity glycine binding to NR1/NR2B receptors.

To further examine whether the NR2-NTDs play a role in determining the different glycine affinities of distinct NMDA receptor subtypes, we used two chimeric constructs in which the NTD of NR2A was replaced by the corresponding NR2B-NTD (NR2A NTD2B), and vice versa (NR2B NTD2A), as detailed previously (Paoletti et al., 2000). NR1/NR2A NTD2B receptors were found to have the same glycine EC_{50} value as wt NR1/NR2B receptors (Fig. 6, A and B; 0.28 ± 0.09 versus $0.39 \pm 0.04 \mu M$; $p > 0.05$, $n = 4$), which was significantly different from the EC_{50} value of the wt NR1/NR2A receptor ($p < 0.01$, $n = 5$). Inversely, NR1/NR2B NTD2A receptors displayed an

TABLE 2

Pharmacology of NMDA receptors assembled from wt and NTD-deleted NR1/NR2B subunits

Glycine and glutamate EC_{50} values were determined in the presence of $100 \mu M$ glutamate or glycine, respectively. IC_{50} values of Zn^{2+} and ifenprodil were obtained by preincubating the cells with the allosteric inhibitor followed by coapplying the inhibitor with $100 \mu M$ each glutamate and glycine. cRNAs were injected at a NR1/NR2 ratio of 1:2, and recordings were performed after 2 to 3 days of expression. Values represent means \pm S.E. Number of experiments was between 5 and 21.

Subunit Composition	I_{max}	EC_{50}		IC_{50}	
		Glu	Gly	Zn^{2+}	Ifenprodil
	μA		μM		μM
NR1/NR2B	3.5 ± 0.4	1.8 ± 0.4	0.39 ± 0.04	6.8 ± 1.7	0.89 ± 0.08
NR1 $^{\Delta NTD}$ /NR2B	3.3 ± 0.5	4.0 ± 1.0	$6.6 \pm 1.6^{**}$	$51 \pm 7^{**}$	$129 \pm 14^{**}$
NR1/NR2B $^{\Delta NTD}$	3.7 ± 0.8	0.95 ± 0.1	$1.8 \pm 0.1^{**}$	$37 \pm 3^{**}$	$140 \pm 14^{**}$
NR1 $^{\Delta NTD}$ /NR2B $^{\Delta NTD}$	4.3 ± 0.3	2.3 ± 0.4	$2.8 \pm 0.6^*$	$126 \pm 29^{**}$	$124 \pm 29^{**}$

* $P < 0.01$.

** $P < 0.001$.

apparent glycine affinity indistinguishable from that of wt NR1/NR2A receptors (Fig. 6, A and B; 2.4 ± 0.4 versus 1.7 ± 0.3 μM , $p > 0.05$, $n = 3$). In contrast, no significant differences in glutamate affinities between wt NR1/NR2A and NR1/NR2B receptors and the respective chimeric receptors were observed (Fig. 6C). Thus, the NTDs of NR2A and NR2B determine not only allosteric inhibition but also the glycine affinity of different NMDA receptor subtypes.

Discussion

In this article, we examined the contributions of the N-terminal LIVBP-homology domains of the NR1 and the NR2 subunits to NMDA receptor assembly, function, and allosteric inhibition. We showed that the NTDs are not required for subunit assembly and channel function. However, high-affinity inhibition by Zn^{2+} or ifenprodil was abolished upon NTD deletion of either the NR1 or NR2 subunit, indicating that both NTDs are required for allosteric receptor inhibition. Furthermore, the different apparent glycine affinities of NR1/NR2A versus NR1/NR2B receptors were found to be determined by their respective NR2-NTDs.

Role of the NTDs in NMDA Receptor Modulation. Several studies have shown that the LIVBP-like domains in both ionotropic and metabotropic GluRs are capable of specifically forming dimers or higher-order oligomers via interdomain interactions (Kuusinen et al., 1999; Kunishima et al., 2000). In non-NMDA receptors of the iGluR family, these interactions have been implicated in subunit assembly (Ayalon and Stern-Bach, 2001; Matsuda et al., 2005). Here, we show that NTD-deleted NMDA receptor subunits form functional channels with agonist-induced currents similar to those of wt receptors; this clearly excludes an essential role of the NTDs in the assembly of NR1/NR2 receptors. This finding is consistent with the data obtained by others (Fayyazuddin et al., 2000; Hu and Zheng, 2005), where deletion of the NR2 NTDs resulted in functional NMDA receptors. However, Meddows et al. (2001) reported that deletion of the first 380 amino acid residues of the NR1 subunit impairs subunit

oligomerization. We attribute this different result to the longer deletion used by these authors than that studied here. Our data are also in agreement with studies obtained for other members of the iGluR family, which demonstrate proper assembly of natural and recombinant subunits lacking an NTD (Chen et al., 1999; Pasternack et al., 2002).

Although interactions between the NTDs of the NMDA receptor subunits are not required for receptor assembly, both thrombin-mediated cleavage of the NR1-NTD and deletion of the NR1- or NR2-NTDs abrogated voltage-independent high-affinity Zn^{2+} and ifenprodil inhibition. This clearly demonstrates that the NR1-NTD is required for the inhibitory effects exerted by these allosteric inhibitors, although both have shown to bind to the NR2-NTDs (overview in Herin and Aizenman, 2004). The residual low-affinity voltage-independent and -dependent inhibition observed upon NTD deletion are probably due to additional binding sites located outside the NTDs and within the channel region, respectively (Paoletti et al., 1997; Traynelis et al., 1998; Rachline et al., 2005).

Model of NTD-Mediated Inhibition. Previous studies indicate that both ifenprodil and Zn^{2+} share common binding sites and mechanisms, which result in increased NMDA receptor desensitization upon binding-induced domain closure of the LIVBP-homology region (Chen et al., 1997; Paoletti et al., 1997, 2000; Krupp et al., 1998; Low et al., 2000; Zheng et al., 2001). This is also consistent with our finding that removal of the NTDs of the NR1/NR2A receptor slows receptor desensitization. Based on these data, we favor a mechanism of NTD-mediated NMDA receptor inhibition that is adapted from a recent model of AMPA receptor activation (Mayer, 2006) and relies on 1) the crystallographically demonstrated heterodimeric arrangement of NR1 and NR2 subunits (Furukawa et al., 2005) and 2) iGluR desensitization resulting from a disruption of LBD interdomain-interactions (Armstrong et al., 2006). Accordingly, binding of an allosteric inhibitor to the NR2-NTD is proposed to induce closure of the LIVBP-homology domain and to thereby produce a conformational strain, which weakens interdomain interactions be-

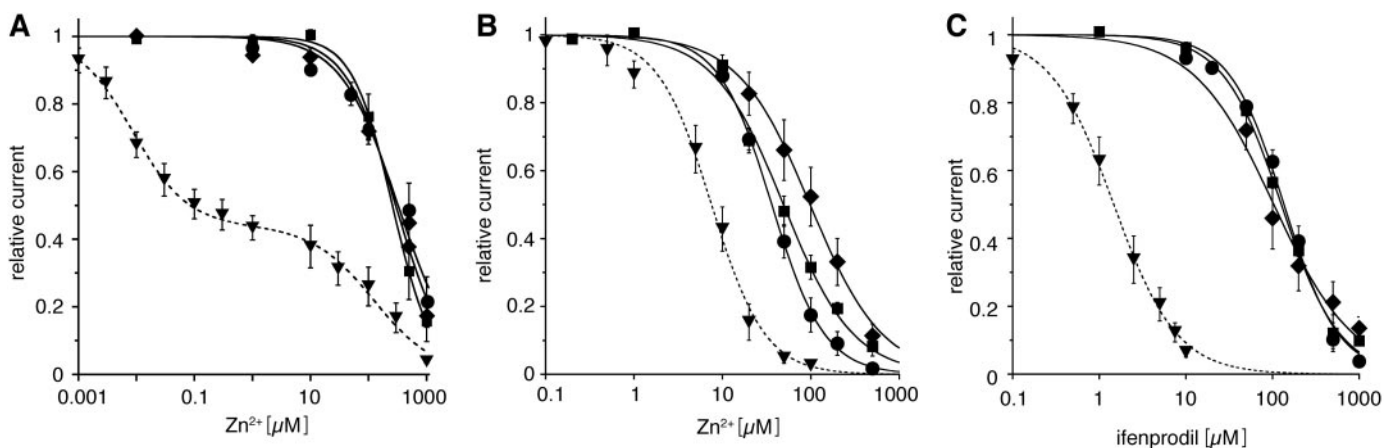


Fig. 4. Allosteric inhibition by Zn^{2+} and ifenprodil of NMDA receptors containing NTD-deleted NR1 and/or NR2 subunits. A and B, inhibition of agonist-evoked currents by Zn^{2+} at wt and NTD-deleted NR1/NR2 receptors. Agonist concentrations were 100 μM glycine and glutamate, each. A, Zn^{2+} inhibition of wt NR1/NR2A (\blacktriangledown), NR1 Δ NTD/NR2A (\blacksquare), NR1/NR2A Δ NTD (\bullet), and NR1 Δ NTD/NR2A Δ NTD (\blacklozenge) receptors. Note biphasic inhibition of the wt receptor, with high (HA) and low-affinity (LA) sites displaying IC_{50} values of 0.012 ± 0.004 μM (60% inhibition) and 225 ± 19 μM (40% inhibition), respectively. HA Zn^{2+} -inhibition was eliminated in all mutant combinations, whereas LA inhibition was not affected. B, Zn^{2+} inhibition of wt NR1/NR2B (\blacktriangledown), NR1 Δ NTD/NR2B (\blacksquare), NR1/NR2B Δ NTD (\bullet), and NR1 Δ NTD/NR2B Δ NTD (\blacklozenge) receptors. C, ifenprodil inhibition of the NR1/NR2B receptor combinations described under B. Note similar residual inhibition of NR1 Δ NTD/NR2B, NR1/NR2B Δ NTD, and NR1 Δ NTD/NR2B Δ NTD receptors for Zn^{2+} and ifenprodil. For IC_{50} values, see Tables 1 and 2.

tween NR1- and NR2-LBDs (Fig. 7). This facilitates receptor desensitization upon agonist binding. An important feature of our model is that only binding of an allosteric modulator to an NR2-NTD stabilized by an adjacent NR1-NTD would be able to sufficiently weaken the interactions between NR1 and NR2 LBDs (Fig. 7) (Armstrong et al., 2006). This implies that the NR1 and NR2 LIVBP homology domains form a heterodimer, an idea that is entirely consistent with both the heterodimeric arrangement of NR1 and NR2 subunits (Furukawa et al., 2005) and our data showing that both the NR1 and NR2 NTDs equally contribute to high-affinity Zn^{2+} and ifenprodil inhibition. Our model assigning an important role to the NTD heterodimer (Fig. 7) is also consistent with the observation that the glycine affinity of NMDA receptors containing chimeric NR2 subunits is determined by their respective NR2-NTDs.

Contribution of NTDs in Determining Agonist Affinity. The pharmacological profile of NMDA receptors is known to crucially depend on the NR2 subunit isoform incorporated (Laurie and Seeburg, 1994; overview in Cull-Candy et al., 2001). For example, NR1/NR2B receptors have a 10-fold higher glycine affinity than NR1/NR2A receptors (Laurie and Seeburg, 1994; Priestley et al., 1995; current study), although both receptors share the same glycine-binding NR1 subunit. Here, we showed that upon coexpression with NR1, a chimeric NR2A subunit containing the NTD of NR2B generates receptors displaying the high glycine affinity characteristic of wt NR1/NR2B receptors. Vice versa, the EC_{50} value of glycine at NR1/NR2B^{NTD2A} receptors was similar to that determined for wt NR1/NR2A receptors. These results

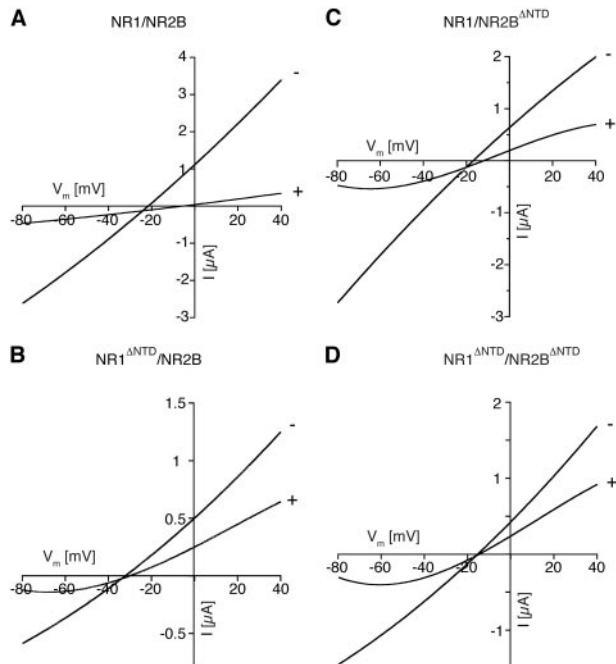


Fig. 5. Effect of the NTD-deletions of the NR1 and/or NR2B subunits on the voltage dependence of Zn^{2+} inhibition. Current-voltage (I-V) relationships for oocytes expressing wt NR1/NR2B (A), NR1^{ΔNTD}/NR2B (B), NR1/NR2B^{ΔNTD} (C), and NR1^{ΔNTD}/NR2B^{ΔNTD} (D) receptors in the absence (–) and presence (+) of Zn^{2+} at the respective IC_{50} value (see Table 2). Note that current-voltage curves for wt NR1/NR2B (A) receptors in the presence of 10 μM Zn^{2+} exhibit only a high-affinity voltage-independent inhibition, whereas NR1^{ΔNTD}/NR2B (B), NR1/NR2B^{ΔNTD} (C) and NR1^{ΔNTD}/NR2B^{ΔNTD} (D) receptors display a combination of a low-affinity voltage-independent and -dependent inhibition in the presence of 100 μM Zn^{2+} .

are consistent with the observation that mutations within NR2-NTDs can affect apparent glycine affinity (Choi et al., 2001). All these findings can be explained by allosteric interactions between the NTDs of the NMDA receptor subunits, which determine both the affinity of glycine binding to the

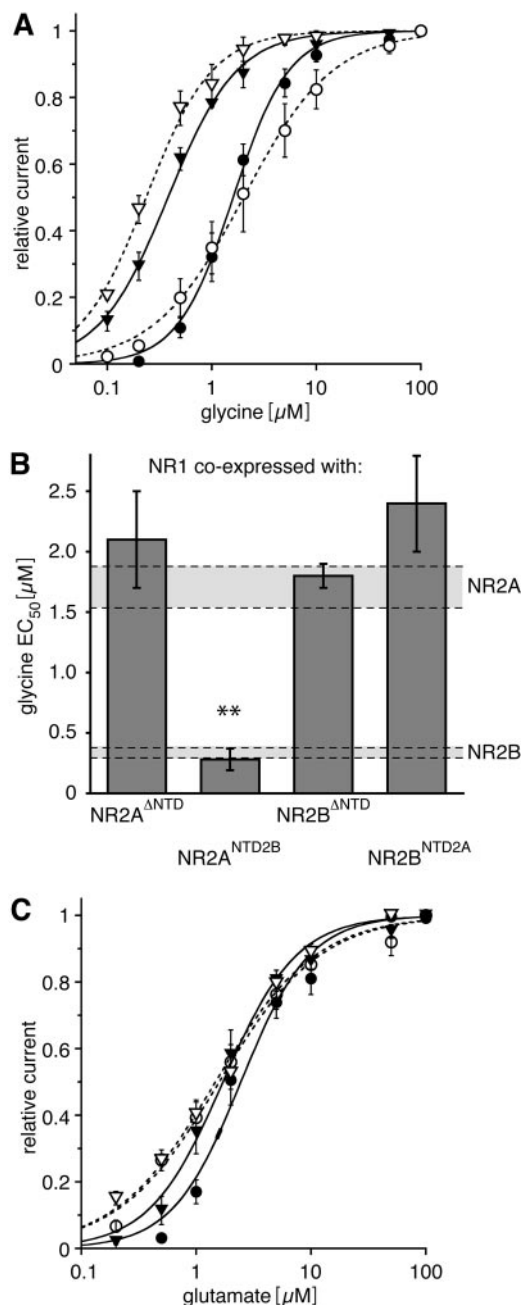


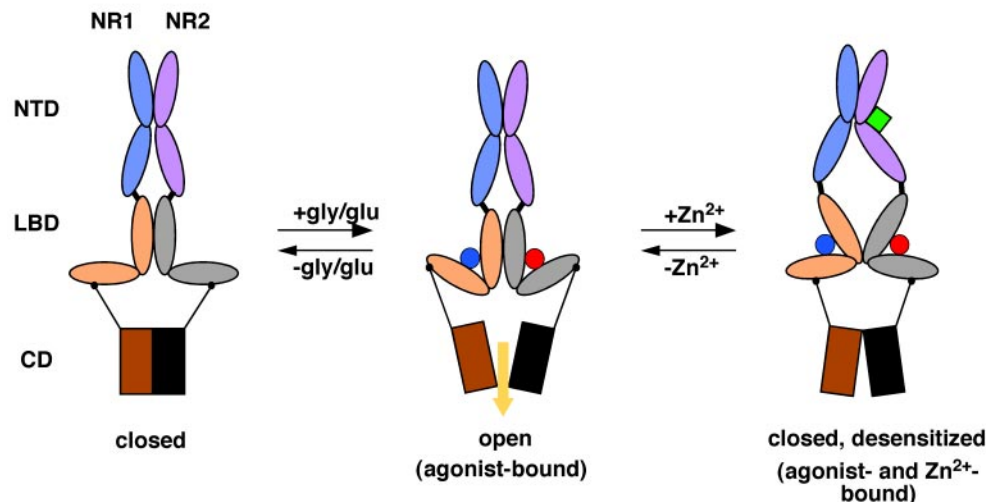
Fig. 6. Agonist response properties of NMDA receptors containing N-terminally deleted and chimeric NR2A or NR2B subunits. A, dose-response curves for glycine determined in the presence of saturating concentrations of glutamate (100 μM) at wt NR1/NR2A (●, $1.7 \pm 0.3 \mu M$) and NR1/NR2B (▼, $0.39 \pm 0.04 \mu M$), and at chimeric NR1/NR2A^{ΔNTD2B} (▽, $0.28 \pm 0.09 \mu M$) and NR1/NR2B^{ΔNTD2A} (○, $2.4 \pm 0.9 \mu M$) receptors. B, comparison of the glycine EC_{50} values of NR1/NR2 receptors containing NTD-deleted and chimeric NR2 subunits compared with the respective wt proteins. Apparent glycine affinities of wt NR1/NR2A and NR1/NR2B receptors (\pm S.E.) are indicated by dotted lines. C, dose-response curves for glutamate determined in the presence of saturating concentrations of glycine (100 μM) for NR1/NR2A (●, $2.6 \pm 0.4 \mu M$), NR1/NR2B (▼, $1.8 \pm 0.4 \mu M$), NR1/NR2A^{ΔNTD2B} (▽, $2.0 \pm 0.3 \mu M$), and NR1/NR2B^{ΔNTD2A} (○, $1.6 \pm 0.5 \mu M$) receptors.

NR1 subunit and the efficacy of allosteric inhibitors at the NR2 subunits.

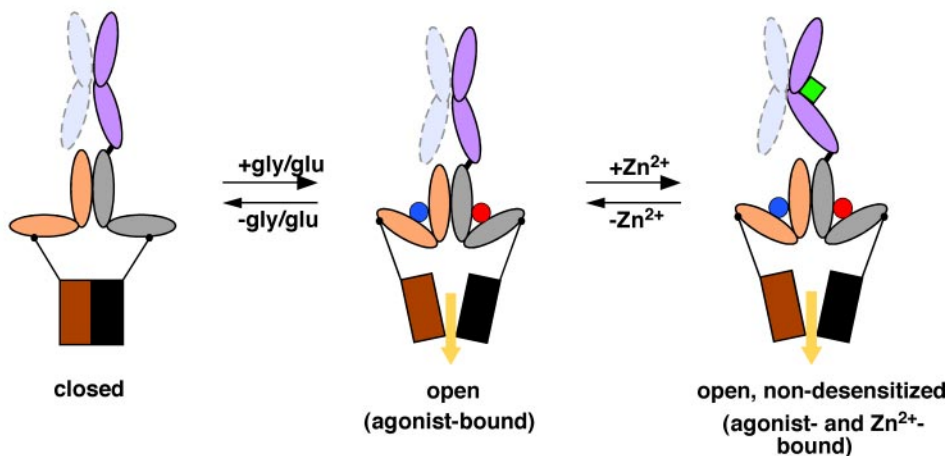
Implications for the Pathology and Therapy of t-PA-Triggered Neurotoxicity. Excessive stimulation of NMDA receptors is known to cause neuronal cell death by apoptosis or necrosis as a result of enhanced Ca^{2+} influx (overview in Cull-Candy et al., 2001). NMDA receptors are tonically inhibited by Zn^{2+} , a mechanism that has been shown to protect neurons against NMDA receptor-mediated glutamate toxicity in vitro (Chen et al., 1997). Here, we demonstrate that deletion of the NR1-NTD by thrombin abolishes high-affinity Zn^{2+} inhibition of NR1/NR2A receptors. Tissue-type plasminogen activator (t-PA), an endogenous serine protease, has been found to potentiate NMDA receptor currents through cleavage of the NR1-NTD, which has been implicated in pathophysiological aspects of glutamatergic neurotransmission (Nicole et al., 2001; Fernández-Monreal et al.,

2004). After focal cerebral ischemia, t-PA triggers the neurotoxic cascade mediated by elevated concentrations of glutamate (Tsirka et al., 1995). Blockade of this serine protease in cortical neuron cultures has been reported to reduce NMDA-induced excitotoxic cell death (Nicole et al., 2001). Because we found a loss in Zn^{2+} inhibition of both NR1/NR2A and NR1/NR2B receptors upon thrombin cleavage and deletion of the NR1-NTD, our results might provide an explanation for the enhanced NMDA receptor activity seen in the presence of t-PA. Accordingly, relief of NMDA receptors from tonic Zn^{2+} inhibition (Rachline et al., 2005) by t-PA-mediated cleavage of the NR1-NTD would result in enhanced Ca^{2+} influx and thereby cause neuronal cell death. This mechanism should be particularly effective at synaptically localized NR1/NR2A receptors, as a result of their high-affinity Zn^{2+} -binding site.

A. wild-type



B. NR1-NTD-truncated



● glutamate ● glycine ◆ Zn^{2+}

Fig. 7. Model illustrating the conformational changes proposed to occur upon Zn^{2+} or ifenprodil binding to wt and NTD-deleted NMDA receptors. Binding of Zn^{2+} or ifenprodil to the open, agonist-bound ion channel is thought to cause a closure of the NR2-NTD. This results in weakening of NR1-NR2-LBD interactions and thereby promotes closure of the channel by enhanced desensitization (see Armstrong et al., 2006). For simplicity, only one NR1-NR2 dimer of the tetrameric receptor is shown. NTD, N-terminal domain; LBD, ligand-binding domain; CD, channel domain. Yellow arrow indicates ion flux through the open channel. A, gating scheme for the wt NR1/NR2 receptor showing the heterodimeric organization of the LBDs and the NTDs of the NR1 and NR2 subunits (left, closed unliganded receptor). Binding of glycine (blue circle) to the NR1-LBD and of glutamate (red circle) to the NR2-LBD results in channel opening (middle). Weakening of NR1-NR2-LBD interactions by binding of Zn^{2+} (green rectangle) or ifenprodil to the respective NR2-NTD leads to a conformational strain, which disrupts the LBD interface and thus drives the receptor into the desensitized closed state (right). B, reaction scheme for the NR1-NTD-truncated receptor. Here, deletion or enzymatic cleavage of the NR1-NTD results in a loss of conformational strain deriving from Zn^{2+} binding, and thereby prevents weakening of LBD interactions. Consequently, the Zn^{2+} occupied receptors resides in its open state. The truncated NR1-NTD still associated with the “core” receptor after thrombin cleavage is indicated by lucent drawing.

Acknowledgments

We thank Dr. P. Paoletti for providing the NR2A^{ΔNTD}, NR2B^{ΔNTD}, NR2B^{NTD2A}, and NR2A^{NTD2B} cDNAs, Dr. A. Nicke for technical advice on metabolic labeling, and Drs. J. R. P. Geiger and B. Mathias-Costa for critical reading of the manuscript.

References

- Armstrong N, Jasti J, Beich-Frandsen M, and Gouaux E (2006) Measurement of conformational changes accompanying desensitization in an ionotropic glutamate receptor. *Cell* **127**:85–97.
- Ayalon G and Stern-Bach Y (2001) Functional assembly of AMPA and kainate receptors is mediated by several discrete protein-protein interactions. *Neuron* **31**:103–113.
- Chen GQ, Cui C, Mayer ML, and Gouaux E (1999) Functional characterization of a potassium-selective prokaryotic glutamate receptor. *Nature* **402**:817–821.
- Chen N, Moshaver A, and Raymond LA (1997) Differential sensitivity of recombinant *N*-methyl-D-aspartate receptor subtypes to zinc inhibition. *Mol Pharmacol* **51**:1015–1023.
- Choi YB, Chen HS, and Lipton SA (2001) Three pairs of cysteine residues mediate both redox and Zn²⁺ modulation of the NMDA receptor. *J Neurosci* **21**:392–400.
- Choi YB and Lipton SA (1999) Identification and mechanism of action of two histidine residues underlying high-affinity Zn²⁺ inhibition of the NMDA receptor. *Neuron* **23**:171–180.
- Cull-Candy S, Brickley S, and Farrant M (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* **11**:327–335.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, and Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* **51**:7–61.
- Fayyazuddin A, Villarroel A, Le Goff A, Lerma J, and Neyton J (2000) Four residues of the extracellular N-terminal domain of the NR2A subunit control high-affinity Zn²⁺ binding to NMDA receptors. *Neuron* **25**:683–694.
- Fernández-Monreal M, López-Atalaya J, Benchenane K, Cacquevel M, Dulin F, Le Caer JP, Rossier J, Jarrige AC, MacKenzie E, Colloc'h N, et al. (2004) Arginine 260 of the amino-terminal domain of the NR1 subunit is critical for tissue-type plasminogen activator-mediated enhancement of *N*-methyl-D-aspartate receptor signalling. *J Biol Chem* **279**:50850–50856.
- Furukawa H, Singh SK, Mancusso R, and Gouaux E (2005) Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* **438**:185–192.
- Herin GA and Aizenman E (2004) Amino-terminal domain regulation of NMDA receptor function. *Eur J Pharmacol* **500**:101–111.
- Hu B and Zheng F (2005) Molecular determinants of glycine-independent desensitization of NR1/NR2A receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **313**:563–569.
- Krupp JJ, Vissel B, Heinemann SF, and Westbrook GL (1998) N-terminal domains in the NR2 subunit control desensitization of NMDA receptors. *Neuron* **20**:317–327.
- Kunishima N, Shimada Y, Tsuji Y, Sato T, Yamamoto M, Kumasaka T, Nakanishi S, Jingami H, and Morikawa K (2000) Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* **407**:971–977.
- Kuryatov A, Laube B, Betz H, and Kuhse J (1994) Mutational analysis of the glycine-binding site of the NMDA receptor: structural similarity with bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron* **12**:1291–1300.
- Kuusinen A, Abele R, Madden DR, and Keinänen K (1999) Oligomerization and ligand-binding properties of the ectodomain of the α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunit GluRD. *J Biol Chem* **274**:28937–28943.
- Laube B, Hirai H, Sturgess M, Betz H, and Kuhse J (1997) Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. *Neuron* **18**:493–503.
- Laube B, Kuhse J, and Betz H (1998) Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *J Neurosci* **18**:2954–2961.
- Laube B, Kuhse J, Rundstrom N, Kirsch J, Schmieden V, and Betz H (1995) Modulation by zinc ions of native rat and recombinant human inhibitory glycine receptors. *J Physiol* **483**:613–619.
- Laurie DJ and Seeburg PH (1994) Ligand affinities at recombinant *N*-methyl-D-aspartate receptors depend on subunit composition. *Eur J Pharmacol* **268**:335–345.
- Low CM, Zheng F, Lyuboslavsky P, and Traynelis SF (2000) Molecular determinants of coordinated proton and zinc inhibition of *N*-methyl-D-aspartate NR1/NR2A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:11062–11067.
- Madden DR (2002) The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat Rev Neurosci* **3**:91–101.
- Madry C, Mesic I, Bartholomäus I, Nicke A, Betz H, and Laube B (2007) Principal role of NR3 subunits in NR1/NR3 excitatory glycine receptor function. *Biochem Biophys Res Commun* **354**:102–108.
- Matsuda S, Kamiya Y, and Yuzaki M (2005) Roles of the N-terminal domain on the function and quaternary structure of the ionotropic glutamate receptor. *J Biol Chem* **280**:20021–20029.
- Mayer ML (2006) Glutamate receptors at atomic resolution. *Nature* **440**:456–462.
- Meddows E, Le Bourdelles B, Grimwood S, Wafford K, Sandhu S, Whiting P, and McIlhinney RA (2001) Identification of molecular determinants that are important in the assembly of *N*-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* **276**:18795–18803.
- Nicole O, Docagne F, Ali C, Margail I, Carmeliet P, MacKenzie ET, Vivien D, and Buisson A (2001) The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med* **7**:59–64.
- Paoletti P, Ascher P, and Neyton J (1997) High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. *J Neurosci* **17**:5711–5725.
- Paoletti P, Perin-Dureau F, Fayyazuddin A, Le Goff A, Callebaut I, and Neyton J (2000) Molecular organization of a zinc binding N-terminal modulatory domain in a NMDA receptor subunit. *Neuron* **28**:911–925.
- Pasternack A, Coleman SK, Jouppila A, Mottershead DG, Lindfors M, Pasternack M, and Keinänen K (2002) α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor channels lacking the N-terminal domain. *J Biol Chem* **277**:49662–49667.
- Perin-Dureau F, Rachline J, Neyton J, and Paoletti P (2002) Mapping the binding site of the neuroprotectant Ifenprodil on NMDA receptors. *J Neurosci* **22**:5955–5965.
- Priestley T, Laughton P, Myers J, Le Bourdelles B, Kerby J, and Whiting PJ (1995) Pharmacological properties of recombinant human *N*-methyl-D-aspartate receptors comprising NR1a/NR2A and NR1a/NR2B subunit assemblies expressed in permanent transfected mouse fibroblast cells. *Mol Pharmacol* **48**:841–848.
- Rachline J, Perin-Dureau F, Le Goff A, Neyton J, and Paoletti P (2005) The micro-molar zinc-binding domain on the NMDA receptor subunit NR2B. *J Neurosci* **25**:308–317.
- Sadtler S, Laube B, Lashub A, Nicke A, Betz H, and Schmalzing G (2003) A basic cluster determines topology of the cytoplasmic M3–M4 loop of the glycine receptor $\alpha 1$ subunit. *J Biol Chem* **278**:16782–16790.
- Traynelis SF, Burgess MF, Zheng F, Lyuboslavsky P, and Powers JL (1998) Control of voltage-independent zinc inhibition of NMDA receptors by the NR1 subunit. *J Neurosci* **18**:6163–6175.
- Tsirka SE, Gualandris A, Amaral DG, and Strickland S (1995) Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature* **377**:340–344.
- Williams K (1996) Separating dual effects of zinc at recombinant *N*-methyl-D-aspartate receptors. *Neurosci Lett* **215**:9–12.
- Yao Y and Mayer ML (2006) Characterization of a soluble ligand binding domain of the NMDA receptor regulatory subunit NR3A. *J Neurosci* **26**:4559–4566.
- Zheng F, Erreger K, Low CM, Banke T, Lee CJ, Conn PJ, and Traynelis SF (2001) Allosteric interaction between the amino terminal domain and the ligand binding domain of NR2A. *Nat Neurosci* **4**:894–901.

Address correspondence to: Bodo Laube, Technische Universität Darmstadt, AG Molekulare und zelluläre Neurophysiologie, Schnittpahstr. 3, 64287 Darmstadt, Germany. E-mail: laube@mpih-frankfurt.mpg.de

Formation of NR1/NR2 and NR1/NR3 Heterodimers Constitutes the Initial Step in *N*-Methyl-D-aspartate Receptor Assembly*

Received for publication, April 27, 2007, and in revised form, October 9, 2007. Published, JBC Papers in Press, October 24, 2007, DOI 10.1074/jbc.M703539200

Thomas Schüler^{‡§1}, Ivana Mesic^{‡§1}, Christian Madry^{‡2}, Ingo Bartholomäus[‡], and Bodo Laube^{‡§3}

From the [‡]Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Frankfurt 60528 and the [§]Technische Universität Darmstadt, AG Molekulare und zelluläre Neurophysiologie, Schnittpahnstrasse 3, Darmstadt 64287, Germany

N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptors are tetrameric protein complexes composed of the glycine-binding NR1 subunit with a glutamate-binding NR2 and/or glycine-binding NR3 subunit. Tri-heteromeric receptors containing NR1, NR2, and NR3 subunits reconstitute channels, which differ strikingly in many properties from the respective glycine- and glutamate-gated NR1/NR2 complexes and the NR1/NR3 receptors gated by glycine alone. Therefore, an accurate oligomerization process of the different subunits has to assure proper NMDA receptor assembly, which has been assumed to occur via the oligomerization of homodimers. Indeed, using fluorescence resonance energy transfer analysis of differentially fluorescence-tagged subunits and blue native polyacrylamide gel electrophoresis after metabolic labeling and affinity purification revealed that the NR1 subunit is capable of forming homo-oligomeric aggregates. In contrast, both the NR2 and the NR3 subunits formed homo- and hetero-oligomers only in the presence of the NR1 subunit indicating differential roles of the subunits in NMDA receptor assembly. However, co-expression of the NR3A subunit with an N-terminal domain-deleted NR1 subunit (NR1^{ΔNTD}) abrogating NR1 homo-oligomerization did not affect NR1/NR3A receptor stoichiometry or function. Hence, homo-oligomerization of the NR1 subunit is not essential for proper NR1/NR3 receptor assembly. Because identical results were obtained for NR1^{ΔNTD}/NR2 NMDA receptors (Madry, C., Mesic, I., Betz, H., and Laube, B. (2007) *Mol. Pharmacol.*, 72, 1535–1544) and NR1-containing hetero-oligomers are readily formed, we assume that heterodimerization of the NR1 with an NR3 or NR2 subunit, which is followed by the subsequent association of two heterodimers, is the key step in determining proper NMDA receptor subunit assembly and stoichiometry.

Excitatory neurotransmission in the mammalian brain is mainly mediated by ionotropic glutamate receptors (iGluRs).⁴ Based on pharmacological studies, iGluRs have been grouped into three distinct subfamilies: (RS)-2-amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolyl)propionic acid (AMPA) receptors, kainate receptors, and *N*-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptors (1). All iGluR subunits share a common modular design of four distinct regions: (i) an extracellular N-terminal domain (NTD) of about 400 amino acids sharing homology with the bacterial leucine-, isoleucine-, and valine-binding protein, implicated to play a role in iGluR oligomerization and modulation, (ii) an extracellular S1S2 ligand binding domain sharing homology with the bacterial glutamine-binding protein that binds agonists in a Venus-flytrap like mechanism, (iii) a membrane-associated domain composed of four membrane segments forming the ion channel, and (iv) an intracellular C-terminal domain involved in linking the receptor to the membrane scaffold and signal transduction proteins (2).

The NMDA subtype of iGluRs is an obligatory hetero-oligomeric membrane protein composed of homologous NR1, NR2, and/or NR3 subunits and plays a key role in brain development, synaptic plasticity, and memory formation (1). Cloning of NMDA receptor subunits revealed that the glycine-binding NR1 subunit is a single gene product occurring in eight splice variants (a–h), whereas the glutamate-binding NR2 and the glycine-binding NR3 subunits are encoded by four (NR2A–NR2D) and two (NR3A and -B) different genes, respectively (1). The so-called “conventional” type of NMDA receptors is a tetrameric membrane protein composed of two NR1 and NR2 subunits, each (3), that requires both glutamate and the co-agonist glycine for channel activation (4). In contrast, receptors composed of NR1 and NR3 NMDA receptor subunits function as excitatory receptors activated exclusively by glycine (5, 6) with a so far unknown subunit stoichiometry. However, tri-heteromeric receptors containing NR1, NR2, and NR3 subunits reconstitute glycine- and glutamate-gated channels, which strikingly differ in channel properties from the respective NR1/NR2 and NR1/NR3 di-heteromers (7, 8). Hence, the proper

* This work was supported in part by the Gemeinnützige Hertie-Stiftung, Frankfurt (to B. L.), Max-Planck-Gesellschaft, Dr. Robert Pflieger Stiftung, Bamberg (to B. L.), and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Grant LA 1086/4-1 to B. L.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ Both authors contributed equally to this work.

² Received a predoctoral fellowship from the Graduiertenkolleg Neuronale Plastizität, Frankfurt.

³ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 49-69-96769-295; Fax: 49-69-96769-441; E-mail: laube@mpi-hirnforschung.frankfurt.mpg.de.

⁴ The abbreviations used are: iGluR, ionotropic glutamate receptor; AMPA, (RS)-2-amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolyl)propionic acid; BN-PAGE, blue native PAGE; CFP, cyan fluorescent protein; *E*, effective FRET efficiency; FRET, fluorescence resonance energy transfer; HEK, human embryonic kidney; *I*_{max}, maximal current; NMDA, *N*-methyl-D-aspartic acid; NTD, N-terminal domain; YFP, yellow fluorescent protein; ECFP, enhanced CFP; EYFP, enhanced YFP; wt, wild type; PNGase, peptide-N-glycosidase F; DTT, dithiothreitol; Tricine, N-[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]glycine.

Assembly of the NMDA Receptor

assembly of the different subunits crucially determines NMDA receptor function and pharmacology.

Studies on native and recombinant iGluRs suggest that their subunits assemble in a two-step mechanism as dimer of dimers (9–12). For the conventional NMDA receptor it has been suggested that receptor assembly occurs via dimerization of an NR1 and an NR2 homodimer (10, 13, 14). However, subunit oligomerization and assembly of NR3 containing NMDA receptor is not completely understood, and many questions remain unanswered. Here, using fluorescently and His-tagged NR1, NR2, and NR3 subunits in combination with fluorescence resonance energy transfer (FRET), blue native PAGE (BN-PAGE) and electrophysiological recordings, we analyzed oligomerization intermediates of the different subunits after heterologous expression in HEK cells and *Xenopus* oocytes. Our results support the idea that NR1/NR2 or NR1/NR3 heterodimers are intermediate states of NMDA receptor assembly and that subunit composition of tetrameric NMDA receptors is defined by a dimer of heterodimers.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents—All reagents were obtained from RBI Sigma (Taufkirchen, Germany).

DNA Constructs, Oocyte Expression, and Electrophysiology—The cDNAs of NMDA receptor subunits NR1-1a (rat), NR2A (mouse), NR2B (mouse) (15), and NR1-1a (mouse) kindly provided by Dr. Seeburg and NR3A (rat) kindly provided by Dr. Woodward were subcloned into enhanced cyan fluorescent protein (ECFP) and into enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) expression vectors, pECFP-N1 and pEYFP-N1 to generate the C-terminally tagged fusion constructs NR1-YFP, NR1-CFP, NR2A-YFP, NR2A-CFP, NR2B-YFP, NR2B-CFP, NR3A-YFP, and NR3A-CFP (see also Fig. 1A). Appropriate restriction sites were introduced by site-directed mutagenesis (QuikChange XL Site-directed Mutagenesis Kit, Stratagene, CA) and confirmed by DNA sequencing as follows: SacI/BamHI for NR1, NheI/BamHI for NR2A, KpnI/BglII for NR2B, and SalI/BamHI for NR3A. Subsequently, the resulting fragments were ligated in-frame with the vectors. To generate N-terminally tagged fusion constructs CFP-NR1 and YFP-NR1, the NR1 subunit cDNA was subcloned into ECFP and EYFP expression vectors, pECFP-C1 and pEYFP-C1 (Clontech). A signal peptide sequence was introduced 5' of the CFP and YFP coding sequences. All constructs were verified by DNA sequencing, electrophysiological recordings, and imaging techniques. The NR1^{ΔNTD} construct was generated by excising the nucleotide sequence encoding for amino acids 23–376 with the restriction endonuclease PvuI. For biochemical characterization in *Xenopus* oocytes, NR1, NR2, and NR3 cDNAs were provided with a C-terminal hexahistidyl tag and subcloned into the pNKS2 oocyte expression vector (16). *In vitro* synthesis of cRNA (mCAP mRNA Capping Kit, Ambion) was performed as described (6). For the expression of NMDA receptors, 25 ng of cRNA/oocyte was injected. *Xenopus laevis* oocytes were isolated and maintained as described (17). Two-electrode voltage-clamp recording of glutamate- and glycine-induced whole cell currents was performed according to a previous study (18).

Transfection of HEK293 Cells—The culture conditions for human embryonic kidney 293 (HEK293) cells (ATCC#CRL1537) and the protocols for transfection with Lipofectamine® 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol have been described previously (19). HEK293 cells were grown in minimal essential medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, 1% (v/v) penicillin-streptomycin (5000 units), 1% (v/v) glutamine and maintained at 37 °C in a 5% CO₂ environment. For transfection cells were plated onto fibronectin (Roche Applied Science)-coated 1-cm glass coverslips for transfection placed in 24-well dishes and maintained in supplement free minimal essential medium. Unless stated otherwise, 0.25 μg of DNA of each construct were used per transfection. Transfected cells were cultured in the presence of the NMDA receptor inhibitor MK801 (100 μM) for 48 h. Cells were fixed 18 h after transfection with 4% (w/v) paraformaldehyde in phosphate-buffered saline for 12 min at room temperature. Non-CFP- or -YFP-tagged NMDA receptor subunits (NR2A-PCIS and NR1-pCis) were antibody labeled after fixation using primary antibodies to the NR1 subunit (1:200, BD Biosciences) and NR2A/B (1:200, Chemicon) and secondary antibody to mouse and rabbit respectively, labeled with Alexa 546 fluorophore. After fixation cells were permeabilized in 0.01 (w/v) Triton X-100 (Serva, Heidelberg, Germany) for 3 min followed by incubation in 2% (w/v) serum albumin for 30 min before processing for immunofluorescence.

Detection and Calculation of FRET Efficiencies Using Acceptor Photo-bleaching—Fluorescence signals were detected with a confocal laser scanning microscope type Leica TCS-SP (Wetzlar, Germany) using dual laser excitation at 458 nm (ECFP) and 514 nm (EYFP) and emission windows of 470–495 nm for ECFP and 565–580 nm for EYFP controlled by the image software Leica-TCS-NT version 1.6.551. All fluorescence data were collected with a 63× objective. Effective FRET efficiency (%) between eCFP (donor) and eYFP (acceptor) was measured with acceptor photo-bleaching methods and quantified using the equation as described previously (20). Images of the donor were obtained before and after bleaching of the acceptor in a selected square (see Fig. 1B). Fluorescence intensities of the donor in this square before and after bleaching were used to calculate the FRET efficiencies according to a previous study (20). The bleaching procedure was unchanged for all experiments. Briefly, 514 nm laser intensity was adjusted to a value not influencing donor emission as was confirmed in cells that were only transfected with CFP fusion constructs. The acceptor was bleached with 10 successive scans to 80–100% to levels comparable to non-transfected neighboring cells.

Metabolic Labeling and Purification of Hexahistidyl-tagged Proteins from *Xenopus* Oocytes—*X. laevis* oocytes were injected with 50-nl aliquots of cRNA (0.5 μg/μl). cRNA-injected and non-injected control oocytes were metabolically labeled by overnight incubation with L-[³⁵S]methionine (>40 TBq/mmol, Amersham Biosciences) at ~100 MBq/ml (0.2 MBq per oocyte) in sterile ND96 solution (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, and 5 mM HEPES, pH 7.4) at 18 °C and chased with 10 mM unlabeled methionine after 24 h as indicated. His-tagged NR1 and NR3A proteins were then purified by Ni²⁺-nitrilotriacetic acid-agarose (Qiagen) chromatography from

n-dodecyl- β -D-maltoside (0.5%, w/v) extracts of oocytes as detailed previously (21). Shortly, oocytes were homogenized in 0.1 M phosphate buffer (20 μ l per oocyte) containing 0.4 mM Pefabloc SC (Fluka, Buchs, Switzerland) and the indicated detergent (*n*-dodecyl- β -D-maltoside, ULTROL Grade, Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, Germany). The homogenate was incubated on ice for 15 min, and the extract was then cleared by centrifugation (10 min at 15,000 rpm in a desktop centrifuge). 100 μ l of the clear supernatant were diluted with 400 μ l of the above buffer and supplemented with 30 μ l of Ni^{2+} -nitrilotriacetic acid-agarose beads and 10 mM imidazole. After 30 min of incubation under continuous inversion, the agarose-bound proteins were washed 4 times with 1 ml of phosphate buffer containing 0.1% *n*-dodecyl- β -D-maltoside, 0.08 mM Pefabloc SC, and 30 mM imidazole. Subsequently, the proteins were released from the Ni^{2+} -nitrilotriacetic acid-agarose beads with non-denaturing elution buffer consisting of 0.5% (w/v) *n*-dodecyl- β -D-maltoside, 100 mM imidazole/HCl (pH 7.8), 20 mM Tris-HCl, and 10 mM EDTA and kept at 0 °C until analyzed by PAGE. For the biochemical determination of subunit stoichiometry, oocytes injected with NR1 and NR3 (wt or His-tagged) subunit cRNAs at the ratios indicated were labeled and purified by Ni^{2+} -nitrilotriacetic acid chromatography as described above. The purified protein was then separated on 10% Tricine-SDS-PAGE gels, which were fixed, dried, and exposed to PhosphorImager screens. The radioactivity of individual [^{35}S]methionine-labeled polypeptide bands was quantified using a PhosphorImager (445 SI, Amersham Biosciences) and evaluated using the software package ImageQuant as described (16).

BN-PAGE and SDS-PAGE—BN-PAGE was carried out as described (22). Just before gel loading, purified proteins were supplemented with blue native sample buffer to a final concentration of 10% glycerol, 0.2% Serva blue G, and 20 mM sodium 6-amino-*n*-capronate, and applied onto polyacrylamide gradient gels. As a size standard, molecular mass markers (Amersham Biosciences) were run in two different lanes on both borders of the gel. This resulted in incomplete separation and thus poor correlation with the molecular mass marker but enabled separation of a wide range of protein sizes in a short time. For SDS-PAGE, protein samples were supplemented with SDS sample buffer containing 20 mM dithiothreitol (DTT) and electrophoresed in parallel with molecular mass markers (Precision Plus Protein All Blue Standard, Bio-Rad) on 10% Tricine-SDS-polyacrylamide gels. Gels were blotted, fixed, dried, and exposed to BioMax MR films (Kodak, Stuttgart, Germany) at -80 °C.

Surface Protein Labeling Using Fluorescent Dyes—After 4 days in culture, oocytes expressing NR1 and NR3A-His subunits were incubated for 20 min at 4 °C in 65 nmol/oocyte of the Cy-NHS-ester dye Cy5 (Amersham Biosciences) in phosphate buffer (20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 8.5; 110 mM NaCl; 1 mM MgCl_2). After washing NMDA receptor complexes were purified as described above. Gels containing Cy5-labeled protein samples were scanned with a gel imager (Typhoon 9400, Amersham Biosciences) as described (6).

Glycosylation Analysis—For analysis of the glycosylation status, 10- μ l aliquots of affinity-purified receptor protein were

supplemented with reducing (20 mM DTT) SDS sample buffer and 1% (w/v) octylglucoside (Calbiochem, La Jolla, CA) and incubated for 2 h at 37 °C with either 5 International Union of Biochemistry (IUB) milliunits of endoglycosidase H or PNGase F (New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Germany) as indicated.

Statistical Analysis—Results represent means \pm S.D. and were analyzed using GraphPad Prism version 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Statistical significance was assessed using one-way analysis of variance with the Newman-Keul multiple comparison test for post hoc comparison of the results obtained from the FRET analyses and considered to be statistically significant at $p < 0.05$. Statistical significance of electrophysiological data was determined at the $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**) levels using a Student's two-tailed *t* test.

RESULTS

In this study, a biophysical and biochemical approach based on FRET and BN-PAGE was used to investigate the role of the NR1, NR2, and NR3 subunits in NMDA receptor oligomerization. For this purpose, spectral variants of the green fluorescent protein were fused to either the C or N terminus of NMDA receptor subunits and analyzed by measuring FRET after acceptor photo-bleaching combined with confocal microscopy (23). Furthermore, BN- and SDS-PAGE analyses of metabolically labeled and under non-denaturing conditions purified NMDA receptor complexes were performed to verify the FRET data by independent biochemical approaches.

Differentially Tagged NR1 Subunits Show a FRET Signal, Indicative for Homo-oligomerization—In an initial set of experiments we calibrated our FRET detection system by analyzing two appropriate controls (i) to quantify the maximal detectable FRET efficiency and (ii) to avoid false-positives of FRET signals by acceptor bleaching (24). We expressed two types of constructs for our controls: (i) a negative control expressing only the soluble enhanced cyan fluorescence (CFP) and enhanced yellow fluorescence (YFP) constructs and (ii) a positive control expressing a CFP-linker-YFP tandem construct, known to provide a strong energy transfer (20, 24). For the CFP-YFP tandem construct, we detected a FRET efficiency of $E = 17.8 \pm 2.1\%$, which is similar to results found in the literature (12, 20, 24). However, co-expression of the soluble CFP and YFP constructs as a negative control yielded a FRET efficiency of $E = 5.1 \pm 0.6\%$, a phenomenon previously also described as pseudo-FRET (24). FRET efficiencies similar to this background signal were subsequently defined as nonspecific association of the respective constructs.

Based on recent biochemical and biophysical results indicating a homo-oligomerization of the recombinant NR1 subunit upon single expression (12, 13), we first analyzed the FRET efficiency of combinations of two differentially tagged NR1 subunits with opposing intra- and extracellular localized fluorophores (Fig. 1). Co-expression of CFP- and YFP-N-terminally tagged NR1 subunits (CFP-NR1 and YFP-NR1, respectively) with an extracellular orientation of the respective fluorophores revealed a highly significant FRET efficiency of $E = 8.7 \pm 1.0\%$ compared with our negative control (Fig. 1; $p < 0.001$). Co-expression of NR1 subunits with both fluorophores fused to the intracellular oriented C terminus (NR1-CFP and

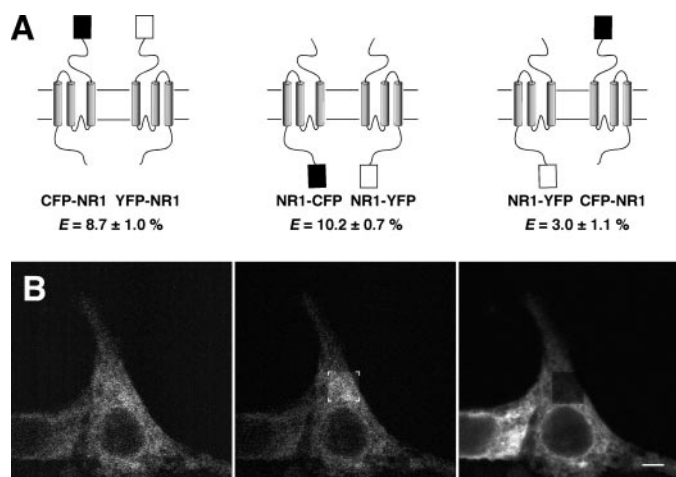


FIGURE 1. Schematic representation of differentially fluorophore-tagged NR1 subunits of the NMDA receptor and an acceptor photobleaching FRET measurement of the NR1-CFP and NR1-YFP construct upon heterologous expression in HEK cells. A, schematic representation of the N- and C-terminal fused YFP and CFP constructs of the NR1 subunit of the NMDA receptor illustrating the extracellular and intracellular orientation of the respective fluorophores. Position of the fluorophore in the NR1 subunit construct is indicated by black or white boxes. Co-expression of CFP- and YFP-N-terminally tagged NR1 subunits (CFP-NR1 and YFP-NR1, respectively) revealed a robust significant FRET efficiency of $E = 8.7 \pm 1.0\%$ (left). Co-expression of NR1 subunits with both fluorophores fused to the intracellular oriented C terminus (NR1-CFP and NR1-YFP), resulted in a slightly stronger FRET efficiency of $E = 10.2 \pm 0.7\%$ (middle). In contrast, combining the extracellularly tagged CFP-NR1 with the intracellularly tagged NR1-YFP subunit resulted in a highly significantly reduced FRET efficiency (CFP-NR1/NR1-YFP; $E = 3.0 \pm 1.1\%$; right). Transmembrane domains of the NR1 subunit are indicated by shaded columns. B, images of the NR1-CFP donor before and after photo-bleaching of the NR1-YFP acceptor in a square of the image view (indicated by a rectangle) after heterologous expression in HEK cells. Inside the bleached region the NR1-CFP donor is unquenched resulting in an increased intensity indicative of FRET. Note that singly expressed NR1 constructs are retained in the ER. Based on the robust and reliable FRET signals of our C-terminal tagged NR1 constructs, we used only C-terminally tagged subunits in our subsequent analyses. Scale bar = 10 μm .

NR1-YFP), again resulted in a strong FRET efficiency of $E = 10.2 \pm 0.7\%$ ($p < 0.001$ (Table 1 and Figs. 1 and 2). In contrast, combining the extracellularly tagged CFP-NR1 with the intracellularly tagged NR1-YFP subunit or *vice versa* resulted in highly significantly reduced FRET efficiencies (NR1-CFP/YFP-NR1: $E = 4.7 \pm 0.4\%$; CFP-NR1/NR1-YFP: $E = 3.0 \pm 1.1\%$ (Table 1 and Fig. 1)), which were similar to the results obtained with the soluble constructs of CFP and YFP ($p > 0.05$ for both). These data are (i) consistent with a proper insertion and orientation of our fluorophores relative to the membrane and (ii) in line with recent data showing an homo-oligomerization of the NR1 subunit in heterologous expression systems (12, 13).

To confirm that our method indeed detects specific subunit interactions mediated by subunit assembly, we measured the FRET efficiency between an N-terminally tagged GluR2 subunit, a member of the AMPA-subtype iGluR family, and the NR1 subunit. Both iGluR subunits co-localize in postsynaptic densities but do not co-assemble (1). Consistent with an efficient homo-oligomerization of the GluR2 subunit, co-expression of the N-terminally tagged CFP-GluR2 and YFP-GluR2 subunits revealed a FRET efficiency of $E = 8.5 \pm 0.9\%$, which is similar to the signal obtained with the respective CFP-NR1 and YFP-NR1 subunits. In contrast, co-expression of the CFP-NR1 and the YFP-GluR2 subunit

TABLE 1

FRET efficiencies of tagged NMDA receptor subunit constructs after acceptor photo-bleaching

FRET efficiencies values (E) of the different fluorophore-tagged constructs upon co-expression in HEK293 cells represent means \pm S.D. from 10–24 independent measurements. p values were determined by analysis of variance with multiple comparison test for post hoc pairwise comparison of the results.

	E %
Control	
NR1-CFP/YFP-NR1	4.7 ± 0.4
NR1-YFP/CFP-NR1	3.0 ± 1.1
Homo-oligomeric combinations	
NR1-CFP/NR1-YFP	10.2 ± 0.7^a
NR1-CFP/NR1-YFP + NR3A	8.1 ± 0.6^a
NR3A-CFP/NR3A-YFP	4.8 ± 0.7
NR3A-CFP/NR3A-YFP + NR1	9.1 ± 1.6^b
NR2A-CFP/NR2A-YFP	5.2 ± 0.8
NR2A-CFP/NR2A-YFP + NR1	9.0 ± 1.8^b
Hetero-oligomeric combinations	
NR3A-CFP/NR1-YFP	10.3 ± 0.6^a
NR3A-CFP/NR2A-YFP	3.5 ± 1.1
NR3A-CFP/NR2A-YFP + NR1	7.1 ± 0.9^b
NR3A-CFP/NR2B-YFP	3.1 ± 0.8
NR3A-CFP/NR2B-YFP + NR1	8.1 ± 1.1^b
NR1-CFP/NR2A-YFP	9.2 ± 0.8^a

^a $p < 0.001$ compared to control.

^b $p < 0.001$ highly significantly different from the respective subunit combination in the absence of the wt NR1 subunit (Student's t test).

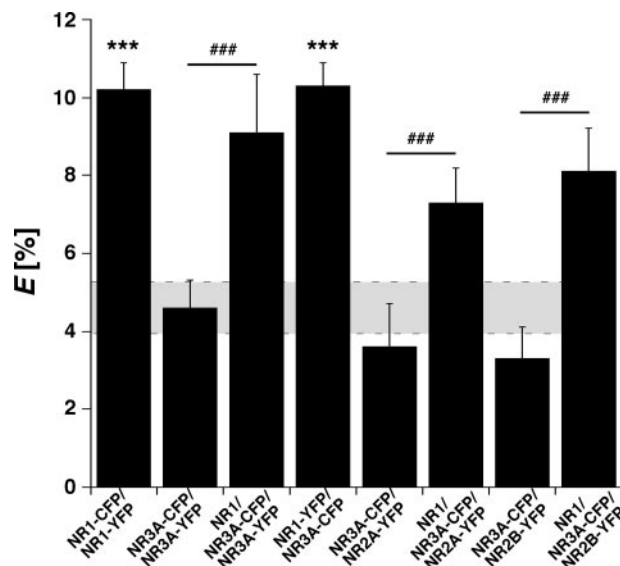


FIGURE 2. FRET efficiencies of different homo- and hetero-oligomeric combinations of NMDA receptor subunits. Mean FRET efficiencies and S.D. (%) measured from HEK cells expressing the different combinations of CFP and YFP-tagged subunits after acceptor photobleaching. Note that neither the NR2 nor NR3 subunits are capable of forming homo- or hetero-oligomers in the absence of the NR1 subunit. Statistical data mentioned in the text are indicated by horizontal bars. Nonspecific pseudo-FRET of the control construct (mean \pm S.D.) is indicated by dotted lines. ***, highly significant different compared with control ($p < 0.001$); ###, highly significantly different compared with the respective subunit combination in the absence of the NR1 subunit ($p < 0.001$).

resulted in a highly significant reduced FRET efficiency of $E = 4.0 \pm 1.3\%$ ($p < 0.01$), a value not statistically different from our negative control ($p > 0.5$). These data showed that (i) NR1 and GluR2 subunits do not oligomerize and (ii) our method allows us to discriminate between randomly co-localized and properly assembled subunits of AMPA- and NMDA-receptor subtypes.

NR2 and NR3 Constructs Display FRET Signals Only after Co-expression with the NR1 Subunit—After demonstrating self-association of the NR1 subunit and based on the assumption that NMDA receptor assembly occurs in a dimer of homodimer fashion (10, 12), we expected that co-expression of NR3A-YFP and NR3A-CFP constructs would result in a strong FRET signal. However, co-expression of these constructs did not result in a significant FRET signal ($E = 4.8 \pm 0.7\%$, $p > 0.5$ (Fig. 2 and Table 1)), suggesting that (i) our C-terminal constructs of the NR3A subunit may not be capable to induce FRET, (ii) the expressed NR3A subunits became rapidly degraded, or (iii) an additional subunit is required for efficient oligomerization.

To test the assumptions mentioned above, we first wanted to know whether our fluorescently tagged NR1 and NR3A constructs are capable of forming functional hetero-oligomeric channels (6). To this end we performed whole cell recordings of combinations of the tagged NR1 and NR3A subunits after heterologous expression in HEK293 cells and *Xenopus* oocytes. Indeed, co-expression of the tagged NR1-CFP and NR3A-YFP constructs provided glycine-induced whole cell inward currents that were similar to the results obtained with the corresponding wt channels (data not shown, see Ref. 6). Because we had compelling evidence that our fluorescence tags do not exert significant effects on subunit assembly and/or ion channel function, we tested the ability of the tagged NR3A subunit to induce FRET upon co-expression with the respective fluorescently tagged NR1 construct. Consistent with our functional analyses, co-expression of the NR1-YFP and NR3A-CFP constructs yielded a strong FRET efficiency of $E = 10.3 \pm 0.6\%$ (Fig. 2 and Table 1), which was highly significantly increased as compared with the FRET efficiency of co-expressed NR3A-CFP and NR3A-YFP constructs and our control ($p < 0.001$ for both (Table 1)). Furthermore, the NR1-YFP and NR3A-CFP FRET signal was similar to that obtained after co-expressing fluorescently tagged NR1 or GluR2 constructs ($p > 0.5$), which is consistent with an efficient hetero-oligomerization of our tagged NR1 and NR3A subunits.

To test whether homo-oligomerization between NR3A subunits might occur in the presence of the NR1 subunit, we analyzed FRET signals upon co-expression of the NR3A-CFP and -YFP constructs with wt NR1. To our surprise, we measured a robust FRET signal ($E = 9.1 \pm 1.6\%$ (Fig. 2 and Table 1)), which was significantly increased to that obtained in the absence of NR1 ($p < 0.01$ (see Table 1)). This result clearly shows that (i) our tagged NR3A constructs can give rise to pronounced FRET signals and (ii) co-expression of the NR1 subunit is necessary to promote NR3A interactions. To examine whether NR1 interactions are affected by overexpressing the NR3A subunit, we co-expressed the NR1-CFP and NR1-YFP constructs together with a 5-fold excess of wt NR3A. The resulting FRET signal was slightly, but not significantly reduced ($E = 8.1 \pm 0.6\%$, $p > 0.05$ (Table 1)) compared with that obtained with the respective NR1 constructs alone. These data indicate that overexpression of the NR3A subunit does not substantially interfere with NR1-NR1 interactions and/or the relative amount of NR1 subunits in the receptor complex, implicating a fixed ratio of NR1/NR3 subunits within the excitatory glycine receptor.

Formation of Tri-hetero-oligomeric Receptors Composed of NR1, NR2, and NR3 Subunits—As previous studies suggest a dimer of homodimer assembly of both NR1- and NR2-homo-oligomers to “conventional” NMDA receptors (10, 12, 14), we wondered how the NR3 subunits can be incorporated into tri-heteromeric NMDA receptors composed of NR1, NR2, and NR3 subunits. We therefore tested the association of the NR3A subunit with either the NR2A or the NR2B subunits. Although co-expression of our NR2-CFP constructs with NR1-YFP yielded functional receptors with strong FRET efficiencies (Table 1), co-expression of the tagged NR3A construct with both tagged-NR2A or -NR2B subunits resulted only in FRET efficiencies not significantly different from our control ($E = 3.5 \pm 1.1\%$ for NR3A-CFP/NR2A-YFP and $E = 3.1 \pm 0.8\%$ for NR3A-CFP/NR2B-YFP (Fig. 2 and Table 1)). Thus, hetero-oligomerization between NR2 and NR3 subunits seems not to exist. Next, we analyzed the capability of NR2 and NR3 subunits to form hetero-oligomers in the presence of NR1. Similar to the results obtained for tagged NR3A subunits in the presence of wt NR1, co-expression of NR3A-CFP and NR2B-YFP, together with wt NR1 generated a significant FRET efficiency of $E = 8.1 \pm 1.1\%$ ($p < 0.01$ compared with co-expression studies in the absence of NR1 (Fig. 2 and Table 1)). Accordingly, exchanging NR2B-YFP with NR2A-YFP also provided a comparable high FRET efficiency (NR1/NR2A-YFP/NR3A-CFP $E = 7.1 \pm 0.9\%$ (Fig. 2 and Table 1)). Therefore, our data substantiate (i) a lack of NR2/NR3 hetero-oligomerization in the absence of NR1 but show (ii) an efficient incorporation of the NR3 subunit into tri-hetero-oligomeric NMDA receptor complexes composed of NR1, NR2, and NR3 subunits (see also Ref. 8). These findings are however difficult to interpret within the context of homo-oligomeric NR1 and NR2 dimers as a prerequisite of NMDA receptor assembly (10, 12; overview in 14). We therefore investigated the capability of the NR2 subunits to form homo-oligomers. Surprisingly, neither co-expression of the respective YFP- and CFP-tagged NR2A ($E = 5.2 \pm 0.8\%$) nor NR2B ($E = 3.4 \pm 1.3\%$) subunits in the absence of NR1 resulted in significant FRET efficiencies (Table 1), indicative for inefficient homo-oligomerization of the respective subunits. This result is, however, not in agreement with a previous study (12) but consistent with the result we obtained with the fluorescently tagged NR3A subunit in the absence of NR1 and a recent study showing in a biochemical assay that NR2 subunits do not form homo-oligomeric aggregates (13). So far, our data indicate that oligomerization of both NR2 and NR3 subunits occur only in the presence of NR1, whereas the NR1 subunit shows a tendency to form homo-oligomeric aggregates.

Analyses of the Excitatory Glycine Receptor by BN-PAGE Indicate a Tetrameric Assembly of 2NR1 and 2NR3 Subunits—Our FRET analyses have shown that the NR1 subunit is capable to form homo-oligomers, whereas the NR2 and NR3 subunits do not associate and require the NR1 subunit for efficient homo- and/or hetero-oligomerization. Because the oligomerization process and stoichiometry of excitatory NR1/NR3 glycine receptor is far from clear, we continued to assess the oligomerization of the NR1 and NR3 subunit with an additional independent assay to identify putative assembly intermediates. We therefore applied the BN-PAGE system (22) after heterol-

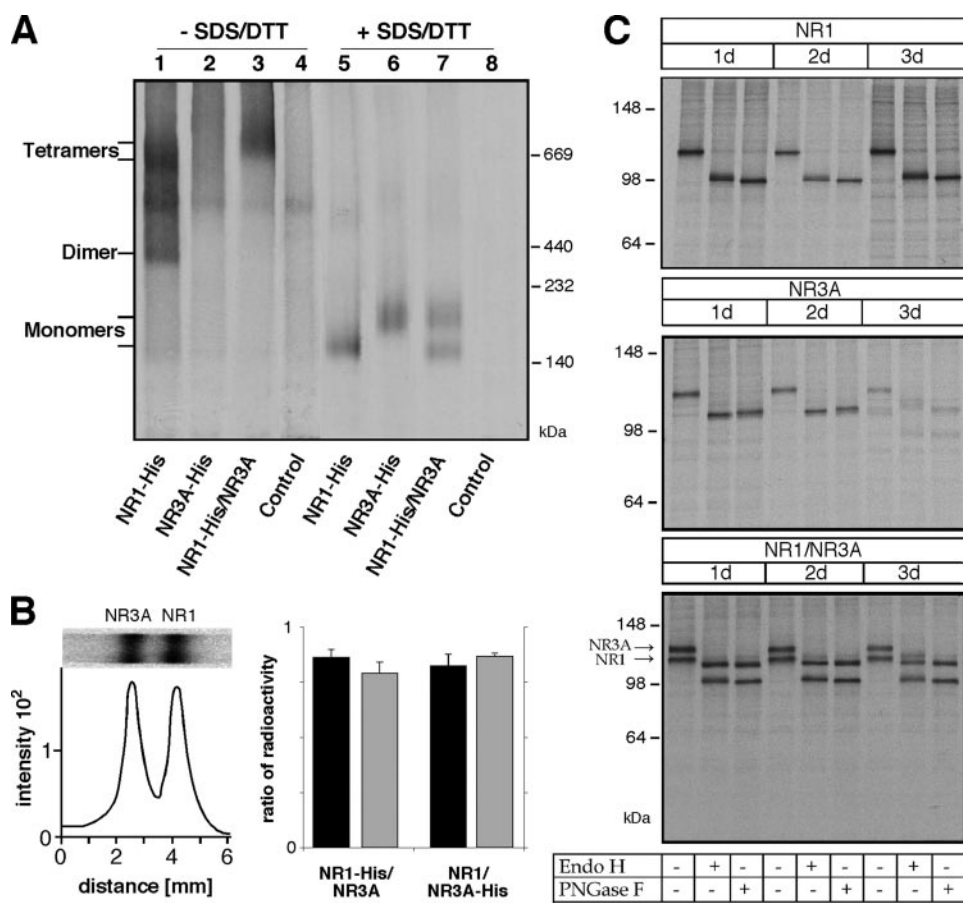


FIGURE 3. Characterization of the oligomerization behavior and subunit ratio of the NR1 and NR3A subunits using BN- and SDS-PAGE. A, oocyte membranes expressing NR1-His, NR3A-His, or NR1-His/NR3A were analyzed after purification using BN-PAGE in the absence and presence of SDS/DTT. The experiment was performed three times with comparable results. The data suggest that the NR1 and NR3A subunits assemble in an invariant 1:1 stoichiometry (lane 7) to form a tetrameric complex (lane 3) that is not present when either the NR1 or NR3A subunit is expressed alone (lanes 1 and 2). However, the NR1-His subunit tends to migrate in defined complexes, whereas the NR3A-His shows no homo-association. B, subunit ratio stoichiometry of the hetero-oligomeric NR1/NR3 NMDA receptor. *Xenopus* oocytes co-expressing a His-tagged NR1 with a non-tagged NR3 subunit or with a His-tagged NR3A with a non-tagged NR1 subunit, respectively, were metabolically labeled with [³⁵S]methionine. Gel lanes were scanned with a PhosphorImager, and the relative ratio of the NR1 to NR3 subunit radioactivity was determined (21). The measured radioactivity ratio of NR1 to NR3A subunit were very similar independent of the subunit ratios used (black column, 1:1; gray column, 1:5). The data are in good agreement with the calculated ratio of 0.91 based on the methionine residues per mature NR1 and NR3A subunit, respectively. C, SDS-PAGE of metabolically labeled and affinity-purified receptors generated by expressing NR1-His (top), NR3A-His (middle), or wt NR1 with His-tagged NR3A (bottom) subunits, respectively. Note comparable protein levels of all subunits at day 1, but significant decline in NR3A expression at day 3. Sensitivity of labeled subunits to endoglycosidase H and PNGase F treatment as indicated below the gel.

ogous expression of the NR1 and NR3 subunit in *X. laevis* oocytes. By using [³⁵S]methionine metabolic labeling of C-terminally hexahistidyl-tagged NR1 and NR3A subunits (NR1-His and NR3A-His, respectively), metal affinity chromatography was performed to purify the respective subunits from digitonin extracts after heterologous expression (6).

The NR1-His subunit isolated under non-denaturing conditions (21) migrated predominantly as a single subunit and two defined oligomers, which likely correspond to monomeric, dimeric, and tetrameric NR1 subunits (Fig. 3A, lane 1). However, the occurrence and the relative ratio of the respective bands detected turned out to be variable (see also Fig. 4A and Refs. 13, 25). To investigate further the number of NR1-His subunits incorporated in the oligomers, 1% SDS was used to weaken non-covalent subunit interactions, to induce dissociation into lower order intermediates. SDS treatment did not

lead to dissociation into monomers (see also Fig. 4A), whereas additional treatment with 100 mM DTT resulted in well defined monomeric NR1 subunits (Fig. 3A, lane 5). In contrast, under non-denaturing conditions isolated NR3-His protein existed in an unspecific aggregate as indicated by the high molecular mass aggregations that migrated at a broad range of masses above that of the NR1 oligomers (Fig. 3A, lane 2). This broad band likely contains an un-defined number of NR3 subunits. By comparing the band pattern produced after treating the NR1-His protein with SDS/DTT (lane 5), the discrete protein band obtained corresponds clearly to monomeric NR3 subunits (Fig. 3A, lane 6), confirming that the NR3 subunit does not form defined homo-oligomers under non-denaturing conditions. Similar results were obtained using an NR2A construct where the C-terminal region from amino acid 930 was replaced by a His₆ tag (NR2A* (see Ref. 6); data not shown). In contrast, a defined hetero-oligomeric complex was formed after co-expression of NR1 and NR3 subunits (Fig. 3A, lane 3), which likely correspond to a tetrameric complex and could be dissociated upon SDS and/or DTT treatment into monomeric NR1 and NR3 subunits (Fig. 3A, lane 7). Quantification of the subunit bands by phosphorimaging revealed that the ratio of the ³⁵S radioactivities contained in the co-isolated NR1 and NR3A polypeptides was very

similar (Fig. 3A, lane 7; data not shown). This is consistent with a 1:1 subunit ratio of the NR1:NR3 receptor calculated from the numbers of 30 and 33 methionine residues per mature NR1 and NR3A subunit, respectively. To determine the stoichiometry of the NR1 and NR3A subunits in the NR1/NR3 receptor complex in more detail, we analyzed by reducing SDS-PAGE extracts of oocytes expressing the NR1 and NR3A subunit (21). Quantification of the NR1 and NR3A subunit bands revealed that the co-isolated non-tagged NR3 subunit contained 1.09-fold more radioactivity than the His-tagged NR1 polypeptide (Fig. 3B). This ratio is entirely consistent with the theoretical value of a calculated subunit stoichiometry of 1NR1:1NR3A. Co-expressing of a 5-fold excess of the NR3A subunit did not change the relative ratio of radioactivity (Fig. 3B), indicating a stable ratio of subunits within the NR1-His/NR3A heteromers. We also performed the reverse experiment and co-

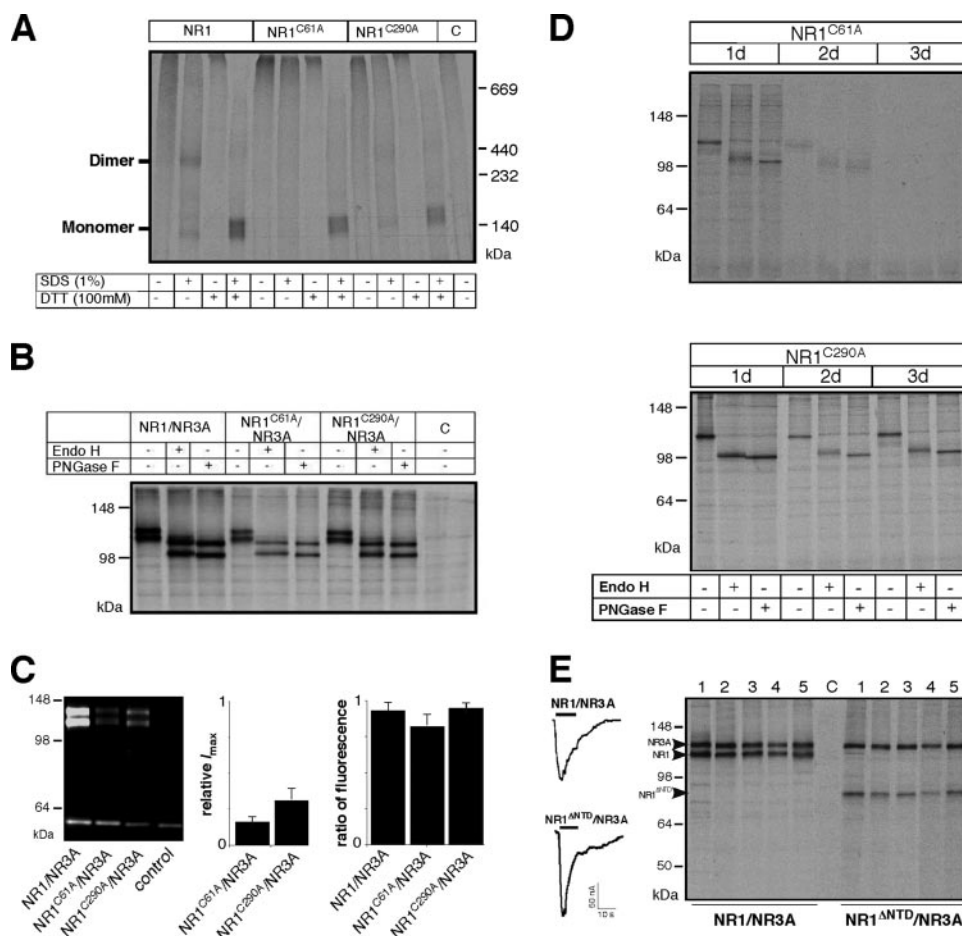


FIGURE 4. Biochemical and electrophysiological characterization of the mutants NR1^{C61A} and NR1^{C290A} and the N-terminal deletion construct NR1^{ΔNTD} upon co-expression with the NR3A subunit. A, oocytes membranes expressing NR1-His, NR1^{C61A}-His, or NR1^{C290A}-His subunits were analyzed after purification using BN-PAGE. The experiment was performed three times with comparable results. The data suggest that mutating cysteine residues Cys-61 or Cys-290 to alanine in the NTD of the NR1 subunit impair NR1 homo-oligomerization. B, SDS-PAGE of metabolically labeled and affinity-purified receptors generated by co-expressing wt NR1 with His-tagged NR3A, NR1^{C61A} with His-tagged NR3A, and NR1^{C290A} with His-tagged NR3A subunits, respectively. Sensitivity of labeled subunits to endoglycosidase H and PNGase F treatment as indicated below the gel. C, SDS-PAGE of NR1^{C61A}/NR3A-His and NR1^{C290A}/NR3A-His receptors affinity purified after Cy5 surface labeling and maximal inducible glycine currents as compared with NR1/NR3A-His wt receptors. Note, that mutation of cysteines 61 and 290 in the NTD of NR1 to alanine impairs NR1/NR3A receptor surface expression (left) and maximal inducible glycine currents (middle) but does not alter relative subunit ratios (right). D, expression pattern of the singly expressed NR1^{C61A} (top) subunit displayed a remarkable reduction of protein amount (see for comparison Fig. 3B), whereas the NR1^{C290A} (bottom) subunit showed only a marginal decline. E, comparison of glycine-evoked currents and protein expression of NR1/NR3A and NR1^{ΔNTD}/NR3A receptors. Left, in contrast to NR1^{C61A} and NR1^{C290A} mutants, the NR1^{ΔNTD} construct showed no difference in maximal inducible glycine currents compared with the wt NR1/NR3A receptor. Right, similar amounts of receptor protein for NR1/NR3A and NR1^{ΔNTD}/NR3A were purified for up to 5 days (lanes 1–5, each) of ³⁵S-labeled oocytes as revealed by SDS-PAGE.

purified the NR1 subunit with the NR3A-His construct. Quantification yielded a ratio of 0.97 of NR1 to NR3 subunit radioactivities (Fig. 3B). Again, co-expression of an excess of the non-tagged subunit (NR1) versus the NR3A-His construct did not change the relative ratio of radioactivity (Fig. 3B). The almost identical ratios obtained in all experiments strongly indicate that the NR1 subunit associates with NR3A in an invariant stoichiometry. Based on the evidences for a tetrameric composition of NR1/NR3 NMDA receptors, our results support a fixed 2NR1:2NR3 subunit stoichiometry of hetero-oligomeric NR1/NR3 NMDA receptors. However, the absence of (i) NR3A subunit intermediate assembly

states analyzed by BN-PAGE and (ii) FRET signals upon co-expression of NR3A-CFP and -YFP constructs shows that the NR3A subunit does not form homo-oligomers, whereas the NR1 protein may adopt several homo-oligomeric states.

Singly Expressed NR1 and NR3 Subunits Display Different Protein Stability, although Both Are Retained in the ER—Next, we addressed the question whether the differential homo-oligomerization properties of the NR1 and NR3 subunits may be associated with (i) a different subcellular localization within the cell and/or (ii) a different protein stability of the respective subunits. We therefore analyzed whether the NR1 and NR3 subunits display a difference in protein stability upon single and co-expression. Fig. 3C (bottom, first lane) shows two bands corresponding to NR1-His and NR3A subunits with apparent molecular masses of 116 and 128 kDa (25, 26), respectively. Affinity purification of both subunits after single cRNA injection and pulse-chase revealed remarkable differences in the stability of the respective subunits. Although similar expression levels of both subunits occurred 1 day after injection (Fig. 3C), a successive decline of the NR3A band intensity was already observed at day 3 (Fig. 3C, middle), whereas band intensities of the NR1 subunit were absolutely stable at day 3 (Fig. 3C). Co-expression of both subunits dramatically increased the stability of the former “instable” NR3A subunit to levels similar to NR1 (Fig. 3C, bottom, and Fig. 4). Thus, our data show that stability of NR1 and NR3A sub-

units are remarkably different upon single expression and that oligomerization with the NR1 increases the stability of the NR3A subunit.

To analyze the subcellular localization of the NR1 and NR3 subunit, we monitored the glycosylation status of the respective subunits by analyzing the sensitivity to treatment with different glycosidases. De-glycosylation of the NR1-His subunit with both endoglycosidase H or PNGase F resulted in a mass shift to ~15 kDa (Fig. 3C, top) consistent with the release of high mannose type N-glycans and a retention of the mature NR1-His polypeptide in the endoplasmic reticulum. Similarly, the NR3-His subunit turned out to be entirely endoglycosidase H- and

PNGase F-sensitive, resulting in a reduced molecular weight (see Fig. 3C, *middle*). Taken together our data demonstrate that both the NR1 and NR3A subunits are retained in the endoplasmic reticulum after single expression, although the ability to form homo-oligomeric intermediates is different.

Mutation of the Cysteines 61 and 290 of the NR1 Subunit Affects Protein Stability Rather Than NR1/NR3 Oligomerization—Different investigators have shown that the NTDs of iGluR subunits are capable of forming interdomain interactions (27–29), which have been implicated in receptor assembly (9, 14, 25, 30). In line with the proposed model of a dimer of homodimer arrangement of conventional NR1/NR2 NMDA receptors (10), Papadakis *et al.* (13) reported about an initial disulfide bond formation by two cysteines (Cys-61 and Cys-290) within the NTD of the NR1 subunit important for NMDA receptor oligomerization. We therefore analyzed the consequences of mutating both cysteines to alanines (NR1^{C61A} and NR1^{C290A}) for NR1/NR3A receptor assembly and subunit stoichiometry. Expression of the NR1 mutants isolated in the presence of 1% SDS, but in the absence of DTT, revealed a complete loss of both NR1 mutants to form homo-oligomers (Fig. 4A). Analysis of the NR1^{C61A} and NR1^{C290A} mutants upon co-expression with the NR3A subunit by SDS-PAGE revealed a reduction of the [³⁵S]methionine-labeled subunit bands, but no change in the respective relative ratios compared with wt NR1/NR3A receptors (Fig. 4B, data not shown). However, functional analysis of wt NR1/NR3, NR1^{C61A}/NR3A, and NR1^{C290A}/NR3A receptors upon expression in *Xenopus* oocytes revealed a significant reduction in maximal inducible glycine currents for both cysteine mutants (>65% reduction, *p* < 0.01; Fig. 4C). To investigate whether the reduced currents seen for the NR1 mutants are due to a reduced plasma membrane insertion and/or altered stoichiometry of the NR1/NR3A surface receptors, we performed surface-labeling experiments by using a Cy5-NHS-ester based protocol (6). Consistent with the electrophysiological data, affinity purification of NR1/NR3A-His receptors from Cy5 surface-labeled oocytes demonstrated that the assembled mutant receptors were present to a lesser extent at the cell surface (Fig. 4C). Analyses of the fluorescence intensities of the NR1 cysteine mutants compared with the respective NR3A-His band revealed again similar subunit stoichiometries as obtained upon co-expression of the wt NR1/NR3A-His subunits (Fig. 4C). These data show that surface-localized NR1^{C61A}/NR3A-His and NR1^{C290A}/NR3A-His receptors maintain an invariant 2NR1:2NR3 stoichiometry.

Because the cysteines NR1^{C61} and NR1^{C290} in the NTD of the NR1 seem not to be crucial for NR1/NR3A receptor assembly and/or stoichiometry, we speculated whether these cysteines may contribute to protein stability of the NR1 subunit. We therefore investigated the expression pattern of singly expressed NR1^{C61A} and NR1^{C290A} subunits for 3 days after cRNA injection into *Xenopus* oocytes. Consistent with this assumption, the NR1^{C61A} subunit showed a reduction and decline of protein amount already after the first day (compare Figs. 3B (*top*) and 4D), whereas the expression pattern of the NR1^{C290A} subunit was not remarkably affected (Fig. 4D). Thus, based on our electrophysiological, metabolic, and surface-labeling data, the cysteines NR1^{C61} and NR1^{C290} seem to be most

important for NR1 protein stability, folding, or surface targeting rather than determining subunit stoichiometry and assembly of the NR1/NR3 protein complex.

Deletion of the Entire NR1 NTD Does Not Impair NR1/NR3A Receptor Assembly and Function—To further investigate the importance of the NR1-NTD in mediating NR1 homo-oligomerization and subsequent receptor assembly, we examined whether an N-terminally truncated NR1 subunit, which lacks the entire NR1-NTD (NR1^{ΔNTD}, amino acids 5–358 of the mature NR1 subunit), forms functional hetero-oligomeric NR1/NR3A NMDA receptors. Co-expression of NR1^{ΔNTD} and NR3A subunits in *Xenopus* oocytes resulted in functional receptors with maximal inducible glycine currents similar to wt NR1/NR3A receptors (Fig. 4E, *left*; see also 6) indicating an efficient assembly of the NR3A with the NR1^{ΔNTD} subunit. To analyze the stoichiometry of the NR1^{ΔNTD} and NR3A subunits in the receptor complex, we co-purified the NR1^{ΔNTD} subunit with a His-tagged NR3A subunit. Fig. 4E (*right*) shows two ³⁵S-labeled subunit bands corresponding to the NR1^{ΔNTD} and NR3A subunit with molecular masses of 70 and 128 kDa, respectively. Quantification of the respective subunit bands revealed a ratio of 0.6 ± 0.1 (*n* = 3) of NR1^{ΔNTD} to NR3A subunit radioactivities that was not affected by increasing amounts of NR1^{ΔNTD} cRNA injected (data not shown). Due to a lower number of 18 methionine residues in NR1^{ΔNTD} as compared with wt NR1, a ratio of 0.6 ± 0.1 is consistent with a 1:1 ratio of NR1^{ΔNTD} to NR3A-His subunits (theoretical ratio 0.55). Because both the absolute intensities of the NR3A-His and the relative ratios of the NR1 and NR3A polypeptide bands were not different in NR1/NR3A-His and NR1^{ΔNTD}/NR3A-His expressing oocytes (Fig. 4E, *right*), our data strongly indicate that (i) both the wt NR1 and NR1^{ΔNTD} subunits assemble at an invariant 1:1 stoichiometry with the NR3A-His, and that (ii) both NR1 polypeptides have similar assembly efficiencies. In conclusion, NR1/NR3A receptor formation does not depend on the NTD of the NR1 subunit. Thus, our results show that neither mutating the cysteines 61 and 290 in the NR1-NTD nor deleting the entire leucine-, isoleucine-, and valine-binding protein-homology domain of the NR1 subunit does interfere with both oligomerization and stoichiometry of the excitatory NR1/NR3A glycine receptor. Because the deletion of the entire NR1-NTD did not affect expression efficiency and function of NR1/NR3A receptors, we interpret this finding as an indication that the reduced NR1/NR3 receptor cell surface expression seen upon mutating the cysteines 61 or 290 is likely explained by incorrect folding of the polypeptide chain or impaired membrane targeting.

Conclusions—Our data allow us to propose a model of subunit assembly for the excitatory NR1/NR3 glycine receptor (see also “Discussion”). Following association of an NR1 subunit with an NR3 subunit, two heteromeric dimers can then associate to complete the formation of a tetrameric ion channel composed of 2NR1 and 2NR3 subunits. However, NTD-mediated homo-oligomerization of the NR1 subunit previously assumed to be a prerequisite for conventional NMDA receptor assembly is not essential for subunit association of the NR1/NR3 (this study) and NR1/NR2 (31) receptors, but may increase the sta-

bility of the NR1 subunit in the absence of other NMDA receptor subunits.

DISCUSSION

Here, by using a combination of FRET and native PAGE, we elucidated key steps controlling NMDA receptor oligomerization and subunit stoichiometry. As expected from the hetero-oligomeric nature of NR1/NR2 and NR1/NR3 receptors, co-expression of NR1-YFP and NR2-CFP or NR3A-CFP constructs resulted in strong FRET signals and functional channels with the expected pharmacology. However, only single expression of the NR1 subunit yielded in a strong FRET efficiency, indicating different homo-oligomerization behavior of the NR1 *versus* the NR2 and NR3A subunits. Analysis of BN-PAGE of NR1, NR2, and NR3 subunits revealed that neither the NR2 (25, 32) nor the NR3 (this study) subunits are capable of forming homo-oligomers, whereas the NR1 subunit showed a tendency to associate to higher ordered complexes (13, 25, 32 and this study). However, deletion of the entire NR1-NTD abolishing NR1 homo-oligomerization, did neither impair receptor assembly nor function (31, this study). Assuming a tetrameric structure of NR1/NR3 receptors, we propose the formation of an initial heterodimeric NR1/NR3 intermediate assembly complex enabling the subsequent association of an additional heterodimer, which can be also composed of an NR1/NR2 dimer, because homo-oligomerization of the NR1 subunit seems also not required for the assembly of conventional NMDA receptors composed of NR1 and NR2 subunits (31).

Role of the NR1-NTD in NMDA Receptor Assembly—It has been shown that the conventional tetrameric NMDA receptor is composed of two glycine-binding NR1 and two glutamate-binding NR2 subunits (3, 33), which are proposed to be oriented in a homodimeric arrangement (10, 14). The initial phase of tetramerization of these NMDA receptors is thought to be guided by an N-terminal recognition domain (NTD) (13, 25), a domain also implicated in NMDA receptor modulation (34). The function of the NTDs in assembly process would therefore be 2-fold, (i) providing stabilizing interactions for some, and (ii) prohibiting the interaction of other subunits. Because all conventional NMDA receptors characterized so far contain two NR1 subunits, the formation of an N-terminal NR1-NR1 disulfide-linked homodimer by the cysteines Cys-61 and Cys-290 (13) would be mechanistically an attractive stable intermediate to initiate the subsequent recruitment of an NR2 homodimer (12). Dimerization of an NR1 and an NR2 homodimer was therefore thought to be the prerequisites for proper NMDA receptor assembly (14). However, we can show that when (i) both cysteines are mutated and (ii) the entire NTD of the NR1 subunit is removed, functional NR1/NR3 channels are still formed. In addition, we can show that homo-oligomerization of the NR1 subunit is not involved in NR1/NR3 subunit assembly and that the loss of the NTD of the NR1 subunit does not affect NR1/NR3 subunit stoichiometry, indicating a different role of the NR1-NTD within excitatory glycine receptor function. This is also true for conventional NMDA receptors, because co-expression of (i) NR1^{C61A} or NR1^{C290A} mutants with wt NR2 subunits (35, 36) and (ii) NTD-deleted

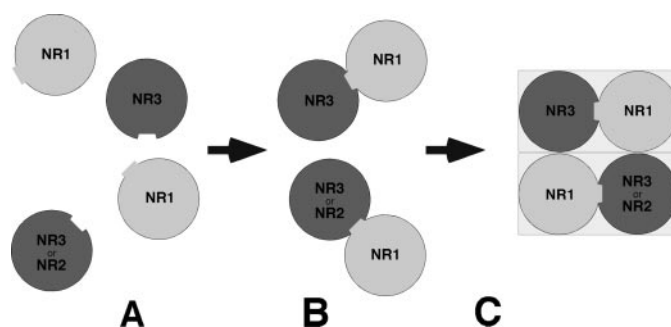


FIGURE 5. Schematic model for the dimer of heterodimers assembly mechanism of the NMDA receptor. Our model is based on (i) that neither the NR2 nor the NR3 subunits do form homo- and hetero-oligomers in the absence of NR1 (25, 32 and this study), (ii) homo-oligomerization of the NR1 subunit is not required for proper receptor assembly (31 and this study), and (iii) the finding that the ligand binding domains of NMDA receptors function as a heterodimer (6, 33). We therefore suggest two basic steps in NMDA receptor assembly: A, heterodimerization of an NR1 subunit with an NR2 or NR3 subunit; B, dimerization of two NR1/NR2 or NR1/NR3 heterodimers to the tetrameric complex resulting in di-heteromeric NR1/NR2 and NR1/NR3 or tri-heteromeric NR1/NR2/NR3 receptors. The intermediate dimers (B) are assumed to assemble in a symmetric fashion (C). The pairs of fused circles (C) represent functional dimers (6, 33) within the tetrameric NMDA receptor complex.

NR1 and NR2 subunits (28, 31) results in functional conventional NMDA receptor channels. As mutating the cysteine residues Cys-61 and Cys-290 impair the stability and membrane targeting of singly expressed NR1 subunits, respectively, we speculate that disulfide bridges mediating NR1 homo-oligomerization might reduce protein degradation in the ER resulting in a stable NR1 subunit pool in the absence of other NMDA receptor subunits (32, 37).

Model For the Assembly of Tri-heteromeric NMDA Receptors—Here we can show, that in the absence of the NR1 subunit the NR2 and NR3 subunits do not associate in a homo-oligomeric fashion. These findings imply that the formation of NR2 and NR3 homodimers is very unlikely (see also Refs. 25, 32), whereas hetero-oligomeric NR1/NR2 and NR1/NR3 complexes are predicted to form readily. In line with our results, Gouaux and colleagues have shown that the functional entity of conventional NR1/NR2 NMDA receptors is a heterodimeric arrangement of NR1 and NR2 subunits (33), which seems to be true also for the excitatory glycine receptor composed of NR1/NR3 subunits (6). However, because the NR2 and NR3 subunits do not homo-oligomerize and homo-oligomerization of the NR1 subunit is not essential for NMDA receptor assembly, we provide evidence for a two-step assembly pathway of NMDA receptors by association of an NR1 subunit with an NR2 or NR3 subunit into an initial heterodimer, which is followed by the subsequent association of an additional heterodimer to complete the tetrameric subunit arrangement (Fig. 5). These NR1/NR2 and NR1/NR3 heterodimers would also display the optimal configuration for the assembly to a tetrameric receptor complex composed of all three subunits, which (i) restricts the number of the glycine-binding NR1 subunits to two and (ii) regulates the differential incorporation of NR2 and NR3 subunits. The intact tri-hetero-oligomeric channel would therefore have a stoichiometry of 2NR1:1NR2:1NR3, which is consistent with the findings of hetero-oligomeric NR1/NR2/NR3 NMDA receptor combinations *in vivo* (8).

REFERENCES

- Cull-Candy, S., Brickley, S., and Farrant, M. (2001) *Curr. Opin. Neurobiol.* **11**, 327–335
- Madden, D. R. (2002) *Nat. Rev.* **3**, 91–101
- Laube, B., Kuhse, J., and Betz, H. (1998) *J. Neurosci.* **18**, 2954–2961
- Johnson, J. W., and Ascher, P. (1987) *Nature* **325**, 529–531
- Chatterton, J. E., Awobuluyi, M., Premkumar, L. S., Takahashi, H., Talantova, M., Shin, Y., Ciu, J., Tu, S., Sevarino, K. A., Nakanishi, N., Tong, G., Lipton, S. A., and Zhang, D. (2002) *Nature* **415**, 793–798
- Madry, C., Mesic, I., Bartholomäus, I., Nicke, A., Betz, H., and Laube, B. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **354**, 102–108
- Das, S., Sasaki, Y. F., Rothe, T., Premkumar, L. S., Takasu, M., Crandall, J. E., Dikkes, P., Conner, D. A., Rayudu, P. V., Cheung, W., Chen, H. S., Lipton, S. A., and Nakanishi, N. (1998) *Nature* **393**, 377–381
- Pérez-Otano, I., Schulteis, C., Contractor, A., Lipton, S. A., Trimmer, J., Sucher, N., and Heinemann, S. F. (2001) *J. Neurosci.* **21**, 1228–1237
- Ayalon, G., and Stern-Bach, Y. (2001) *Neuron* **31**, 103–113
- Schorge, S., and Colquhoun, D. (2004) *J. Neurosci.* **23**, 1151–1158
- Tichelaar, W., Safferling, M., Keinänen, K., Stark, H., and Madden, D. R. (2003) *J. Mol. Biol.* **344**, 435–442
- Qiu, S., Hua, Y. L., Yang, F., Chen, Y. Z., and Luo, J. H. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 24923–24930
- Papadakis, M., Hawkins, L. M., and Stephenson, F. A. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 14703–14712
- Stephenson, A. (2006) *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 877–881
- Kuryatov, A., Laube, B., Betz, H., and Kuhse, J. (1994) *Neuron* **12**, 1291–1300
- Grudzinska, J., Schemm, R., Häger, S., Nicke, A., Schmalzing, G., Betz, H., and Laube, B. (2005) **45**, 727–739
- Laube, B., Kuhse, J., Rundstrom, N., Kirsch, J., Schmieden, V., and Betz, H. (1995) *J. Physiol.* **483**, 613–619
- Laube, B., Hirai, H., Sturgess, M., Betz, H., and Kuhse, J. (1997) *Neuron* **18**, 493–503
- Laube, B., Kuhse, J., and Betz, H. (2000) *J. Physiol.* **522**, 215–230
- Zimmermann, T., Rietdorf, J., Girod, A., Georget, V., and Pepperkok, R. (2002) *FEBS Lett.* **531**, 245–249
- Sadtler, S., Laube, B., Lashub, A., Nicke, A., Betz, H., and Schmalzing, G. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 16782–16790
- Schägger, H., Cramer, W. A., and von Jagow, G. (1994) *Anal. Biochem.* **217**, 220–230
- Kenworthy, A. K. (2001) *Methods* **24**, 289–296
- Karpova, T. S., Baumann, C. T., He, L., Wu, X., Grammer, A., Lipsky, P., Hager, G. L., and McNally, J. G. (2003) *J. Microscopy* **209**, 56–70
- Meddows, E., Le Bourdellès, B., Grimwood, S., Wafford, K., Sandhu, S., Whiting, P., and McIlhinney, R. A. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 18795–18803
- Al-Hallaq, R. A., Jarabek, B. R., Fu, Z., Vicini, S., Wolfe, B. B., and Yasuda, R. P. (2002) *Mol. Pharmacol.* **62**, 1119–1127
- Kuusinen, A., Abele, R., Madden, D. R., and Keinänen, K. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 28937–28943
- Paoletti, P., Perin-Dureau, F., Fayyazuddin, A., Le Goff, A., Callebaut, I., and Neyton, J. (2000) *Neuron* **28**, 911–925
- Matsuda, S., Kamiya, Y., and Yuzaki, M. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 20021–20029
- Leuschner, W. D., and Hoch, W. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 16907–16916
- Madry, C., Mesic, I., Betz, H., and Laube, B. (2007) *Mol. Pharmacol.* **72**, 1535–1544
- Atlason, P. T., Garside, M. L., Meddows, E., Whiting, P., and McIlhinney, R. A. J. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 25299–25307
- Furukawa, H., Singh, S. K., Mancusso, R., and Gouaux, E. (2005) *Nature* **438**, 185–192
- Herin, G. A., and Aizenman, E. (2004) *Eur. J. Pharmacol.* **500**, 101–111
- Laube, B., Kuryatov, A., Kuhse, J., and Betz, H. (1993) *FEBS Lett.* **335**, 331–334
- Choi, Y., Chen, H., and Lipton, S. A. (2001) *J. Neurosci.* **21**, 392–400
- Hall, R. A., and Soderling, T. R. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 4135–4140

Principal role of NR3 subunits in NR1/NR3 excitatory glycine receptor function

Christian Madry, Ivana Mesic, Ingo Bartholomäus, Annette Nicke,
Heinrich Betz ^{*}, Bodo Laube ¹

Abteilung Neurochemie, Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Deutschordenstr. 46, 60528 Frankfurt, Germany

Received 15 December 2006

Available online 28 December 2006

Abstract

Calcium-permeable *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors are tetrameric cation channels composed of glycine-binding NR1 and glutamate-binding NR2 subunits, which require binding of both glutamate and glycine for efficient channel gating. In contrast, receptors assembled from NR1 and NR3 subunits function as calcium-impermeable excitatory glycine receptors that respond to agonist application only with low efficacy. Here, we show that antagonists of and substitutions within the glycine-binding site of NR1 potentiate NR1/NR3 receptor function up to 25-fold, but inhibition or mutation of the NR3 glycine binding site reduces or abolishes receptor activation. Thus, glycine bound to the NR1 subunit causes auto-inhibition of NR1/NR3 receptors whereas glycine binding to the NR3 subunits is required for opening of the ion channel. Our results establish differential roles of the high-affinity NR3 and low-affinity NR1 glycine-binding sites in excitatory glycine receptor function.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: NMDA receptor; Glutamate receptor; Agonist binding; Ligand-gated ion channel; Glycine binding site

The *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) subtypes of ionotropic glutamate receptors (iGluRs) are calcium-permeable ligand-gated cation channels which mediate excitatory neurotransmission in the central nervous system [1]. “Conventional” NMDA receptors are composed of two homologous NR1 and NR2 subunits, each, and require both glutamate and glycine for efficient channel activation [2]. Their glycine- and glutamate-binding sites are formed by homologous segments of the NR1 and NR2 subunits, respectively [3,4]. Mutational analysis and crystal structures of the ligand-binding domains (LBDs) from both subunits have shown that agonist binding occurs in a cleft at the interface between two extracellular lobes (segments

S1, S2) [4,5] and results in LBD closure and opening of the ion channel.

In addition to the NR1 and NR2A–D subunits (overview in [6]), two other NMDA receptor polypeptides have been identified, NR3A and NR3B [7,8]. Upon co-expression with NR1, the NR3 subunits form receptors that are activated by glycine alone, and hence can be classified as excitatory glycine receptors [9]. NR1/NR3 receptors are calcium-impermeable and unaffected by ligands acting at the NR2 glutamate-binding site. Consistent with these findings, the isolated LBD of the NR3A subunit has recently been shown to bind glycine with high-affinity [10]. Further functional characterization of NR1/NR3 receptors has, however, been hampered by the small amplitude of their glycine-elicited currents. Here, we show that glycine binding to the NR1 subunits causes rapid inactivation of NR1/NR3 receptors. In contrast, glycine binding to the NR3 subunit is essential for channel activation. Our results disclose differential roles of the NR1 and

^{*} Corresponding author.

E-mail address: neurochemie@mpi-hfrankfurt.mpg.de (H. Betz).

¹ Present address: TU-Darmstadt, FB Biologie, Schnittspahnstr. 3, 64287 Darmstadt, Germany.

NR3 glycine-binding sites in excitatory glycine receptor function.

Materials and methods

DNA constructs, oocyte expression and electrophysiology. cDNAs of the NR1a, NR2A [3], and NR3A [7] subunits were subcloned in the pNKS2 vector. The NR3B clone [9] was kindly provided by D. Zhang, Burnham Institute, La Jolla (CA), USA. The NR2A*-His construct was generated by replacing the C-terminal region from amino acid 930 with a 6×His tag. Mutations were generated by site-directed mutagenesis (QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene) and confirmed by DNA sequencing. *In vitro* synthesis of cRNA (mCAP mRNA Capping Kit, Ambion) was performed as described [3]. For the expression of NMDARs, 25 ng cRNA/oocyte was injected at a NR1:NR3 (NR2A) ratio of 1:3. *Xenopus* oocytes were isolated and maintained as described [3]. Two-electrode voltage-clamp recording of whole-cell currents was performed according to [4].

Metabolic labelling and purification of NMDA receptor complexes. Injected oocytes were metabolically labelled by overnight incubation with [³⁵S]methionine as described [11]. After an additional 24 h chase interval, the resulting receptor complexes were purified by Ni²⁺-NTA chromatography from 0.5% (w/v) dodecylmaltoside extracts of the labelled oocytes as described [11].

Surface protein labelling using fluorescent dyes. After 4 days in culture, oocytes expressing NR1 and NR3A-His subunits were incubated for 20 min at 4 °C in 65 nmol/oocyte of the Cy-NHS-ester dye Cy5 (Amersham Biosciences) in phosphate buffer (20 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 8.5; 110 mM NaCl; and 1 mM MgCl₂). After washing, NMDA receptor complexes were purified as outlined above.

SDS-PAGE. Proteins were supplemented with SDS sample buffer containing 20 mM dithiothreitol (DTT) and electrophoresed in parallel with molecular mass markers (Precision Plus Protein All Blue Standard, Bio-Rad) on 10% tricine-SDS-polyacrylamide gels. Gels were fixed, dried, and exposed to BioMax MR films (Kodak, Stuttgart, Germany) at −80 °C. Gels containing Cy5-labelled protein samples were scanned with a gel imager (Typhoon 9400, Amersham).

Glycosylation analysis. For analysis of the glycosylation status, 5–10 µl aliquots of affinity-purified receptor protein were supplemented with reducing (20 mM DTT) SDS sample buffer and 1% (w/v) octylglucoside (Calbiochem, La Jolla, CA, USA), and incubated for 2 h at 37 °C with 5 IUB milliunits Endo H or PNGase F (NEB, Frankfurt, Germany).

Results

Assembly and plasma membrane insertion of recombinant NR1/NR3A receptors

NR3 subunits form excitatory glycine receptors upon co-expression with the NR1 subunit [9]. However, these receptors generate only small currents upon agonist application. In order to disclose whether this might reflect inefficient assembly or surface expression, we compared the subunit composition and agonist responses of recombinant NR1/NR3A receptors with those of “conventional” NR1/NR2A NMDA receptors. To this end, hexahistidyl-tagged NR3A (NR3-His) and NR2A* (NR2A*-His; see Materials and methods) subunits were co-expressed with the wild-type (wt) NR1 subunit in *Xenopus* oocytes. After metabolic labelling with [³⁵S]methionine, the recombinant receptors were affinity-purified and analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. This revealed comparable amounts of ³⁵S-labelled NR1/NR3A-His and NR1/NR2A*-His recep-

tor subunits (Fig. 1A). Hence, NR1/NR3A receptors are efficiently synthesized and assembled in the oocyte expression system. However, the maximal inducible currents generated upon superfusion of NR1/NR3A-His and NR1/NR2A*-His expressing oocytes with saturating agonist concentrations differed by a factor of about 25 (0.15 µA vs. >5 µA, Fig. 1B).

To exclude that the small glycine evoked currents of NR1/NR3A receptors are due to an impaired plasma membrane insertion, we performed affinity purification of NR1/NR3A-His receptors from oocytes surface-labelled with a Cy5-NHS ester. SDS-PAGE revealed that the assembled receptor was present at the cell surface (Fig. 1C) at similar quantities than obtained upon co-expression of the NR1/NR2A*-His subunits (data not shown). In contrast, singly expressed NR1-His subunits were not surface-labelled under identical conditions. Furthermore, the apparent molecular masses of the Cy5-labelled subunits were much less reduced upon Endo H as compared to PNGaseF treatment (Fig. 1C), indicating complex *N*-glycosylated proteins located at the cell surface. Thus, the small glycine currents of NR1/NR3A receptors cannot be attributed to intracellular retention.

Comparison of NR1/NR3A and NR1/NR3B receptor currents

Similar to our findings obtained with the NR1/NR3A receptors, oocytes co-expressing the NR1 and NR3B subunits displayed small and rapidly desensitizing maximal glycine-inducible currents (Fig. 1D and E and Table 1) of similar apparent agonist affinity (Fig. 1F and Table 1). However, in contrast to NR1/NR3A receptor responses NR1/NR3B-mediated currents showed a marked decline of the peak current at elevated glycine concentrations (>20 µM) and a pronounced rebound effect upon glycine wash-out (Fig. 1E and F).

Differential effects of NR1 and NR3 glycine site antagonists

To disclose the contributions of the NR1 and NR3 LBDs to receptor activation, we examined the effects of antagonists on glycine-induced currents. Application of 5 µM CNQX, an AMPA receptor antagonist that also binds to the glycine sites of the NR3 and, with lower affinity, NR1 subunits [10], caused an about 80–90% inhibition of the currents evoked by 20 µM glycine at both NR1/NR3A and NR1/NR3B receptors (Fig. 2A and E). This is in agreement with the *K_d* value of CNQX determined with a soluble NR3A-S1S2 LBD construct (2.51 ± 0.35 µM; [10]). In contrast, the NR1-specific glycine site antagonists MDL-29951 (MDL) and L-689560 (L689) did not inhibit but strongly potentiated glycine-evoked currents of NR1/NR3A receptors (Fig. 2B and F). At saturating glycine concentrations (1 mM), currents were potentiated about 25-fold in the presence of 200 nM MDL (Fig. 2B and Table 1). At 500 µM glycine, half-max-

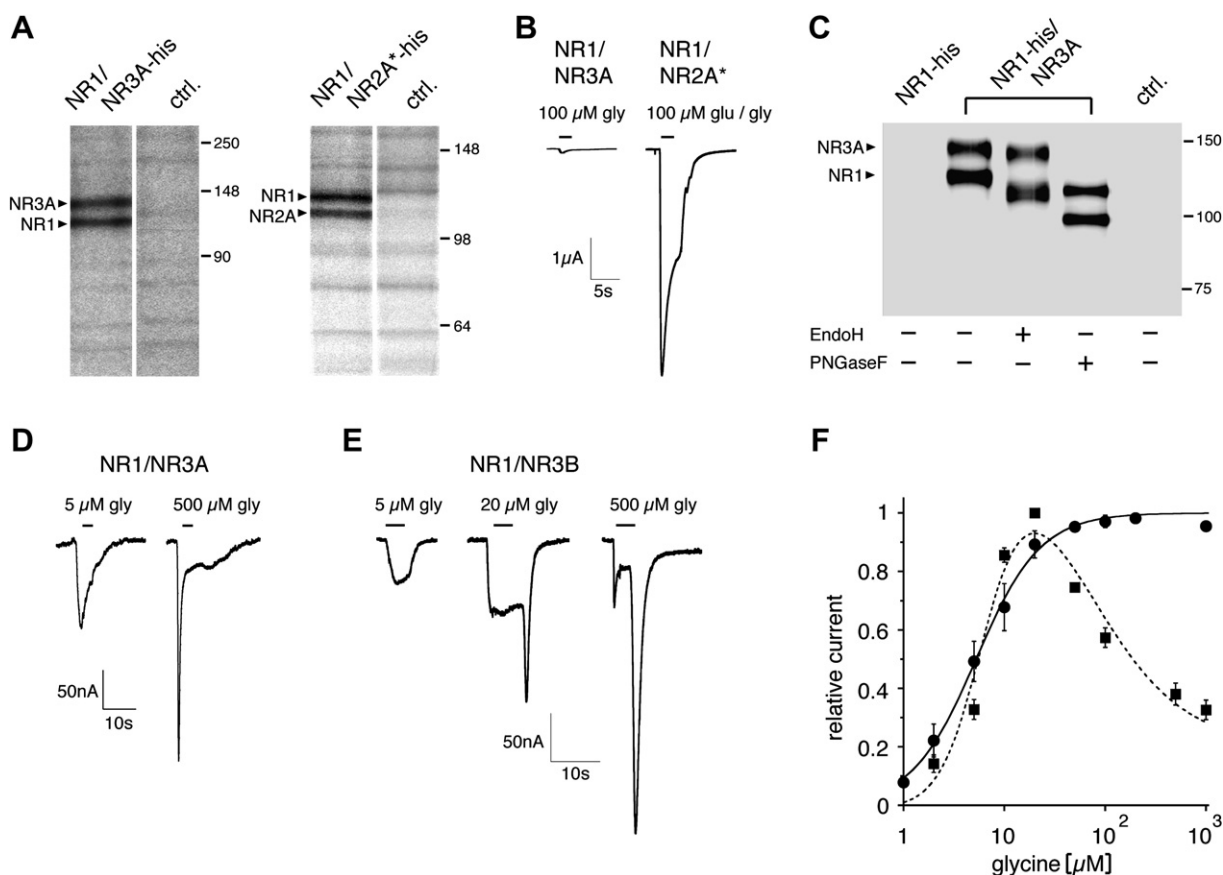


Fig. 1. Heterologous expression and functional characterization of recombinant NR1/NR3 receptors. (A) SDS–PAGE of metabolically labelled and affinity-purified receptors from oocytes co-expressing wt NR1 with His-tagged NR3A (left) and NR2A* (right) subunits, respectively. Note comparable protein levels of all subunits. (B) NR1/NR3A (left) and NR1/NR2A*-His (right) expressing oocytes displayed significant differences in maximal inducible glycine currents. (C) SDS–PAGE of NR1-His/NR3A receptors affinity purified after Cy5 surface labelling as compared to NR1-His expressed alone. Endo H and PNGase F treatment is indicated below respective lanes (ctrl., non-injected oocyte). (D,E) Comparison of glycine-evoked peak currents of NR1/NR3A (D) and NR1/NR3B (E) receptors. NR1/NR3A receptors desensitized more readily at high glycine concentrations (500 μ M) than NR1/NR3B receptors; the latter exhibited a pronounced rebound effect upon agonist washout and a decrease of glycine currents at elevated agonist concentrations ($>20 \mu$ M). (F) Dose–response curves of NR1/NR3A (filled circles) and NR1/NR3B (filled squares) receptors. Error bars in F indicate SE.

Table 1
Pharmacology of wt and mutant NR1/NR3 receptors

Subunit composition	EC ₅₀ (μ M)	I _{max} (μ A)	n
NR1/NR3A	6.5 \pm 1.1	0.2 \pm 0.06	7
NR1/NR3A (MDL)	1444 \pm 200	5.1 \pm 1.4	6
NR1 ^{F466A} /NR3A	82 \pm 11	2.14 \pm 1.0	4
NR1/NR3B	6 \pm 0.3	0.064 \pm 0.016	10
NR1/NR3B (MDL)	413 \pm 18	0.34 \pm 0.05	6
NR1 ^{F466A} /NR3B	148 \pm 24	2.97 \pm 0.7	7

Glycine EC₅₀ values and maximal inducible currents (I_{max}) were determined in the presence and absence of 200 nM MDL-29951 3–5 days after injection of 25 ng cRNA of the indicated NR1 and NR3 subunits. Values represent means \pm SE; n, number of experiments.

imal potentiation by MDL was seen at 21 \pm 1.7 nM (Fig. 2C), a value close to the K_d value of MDL determined at the soluble NR1-S1S2 LBD [12]. NR1/NR3B receptors were also potentiated by MDL, although to a lesser extent (5-fold) (Fig. 2F and Table 1). Notably, in the presence of 200 nM MDL the apparent EC₅₀ values of glycine at NR1/

NR3A and NR1/NR3B receptors were significantly increased (Fig. 2D and G, solid lines, and Table 1). MDL also reduced the rebound effect seen upon agonist washout, indicating that the latter is mediated by NR1. Similar potentiations were also observed with L689 at both NR1/NR3A and NR1/NR3B receptors (data not shown). In summary, antagonists acting at the glycine binding sites of the NR1 and NR3 subunits had opposite effects on channel activity.

Mutations within NR1 and NR3 LBDs mimick the effects of glycine site antagonists

To further corroborate different roles of the NR1 and NR3 glycine binding sites in NR1/NR3 receptor function, mutations were introduced into the respective LBDs. We have previously shown that the mutant NR1^{F466A} causes a ca. 10,000-fold reduction in the apparent glycine affinity of NR1/NR2B receptors [3]. Co-expression of NR1^{F466A} with the wt NR3A or NR3B subunits resulted in large gly-

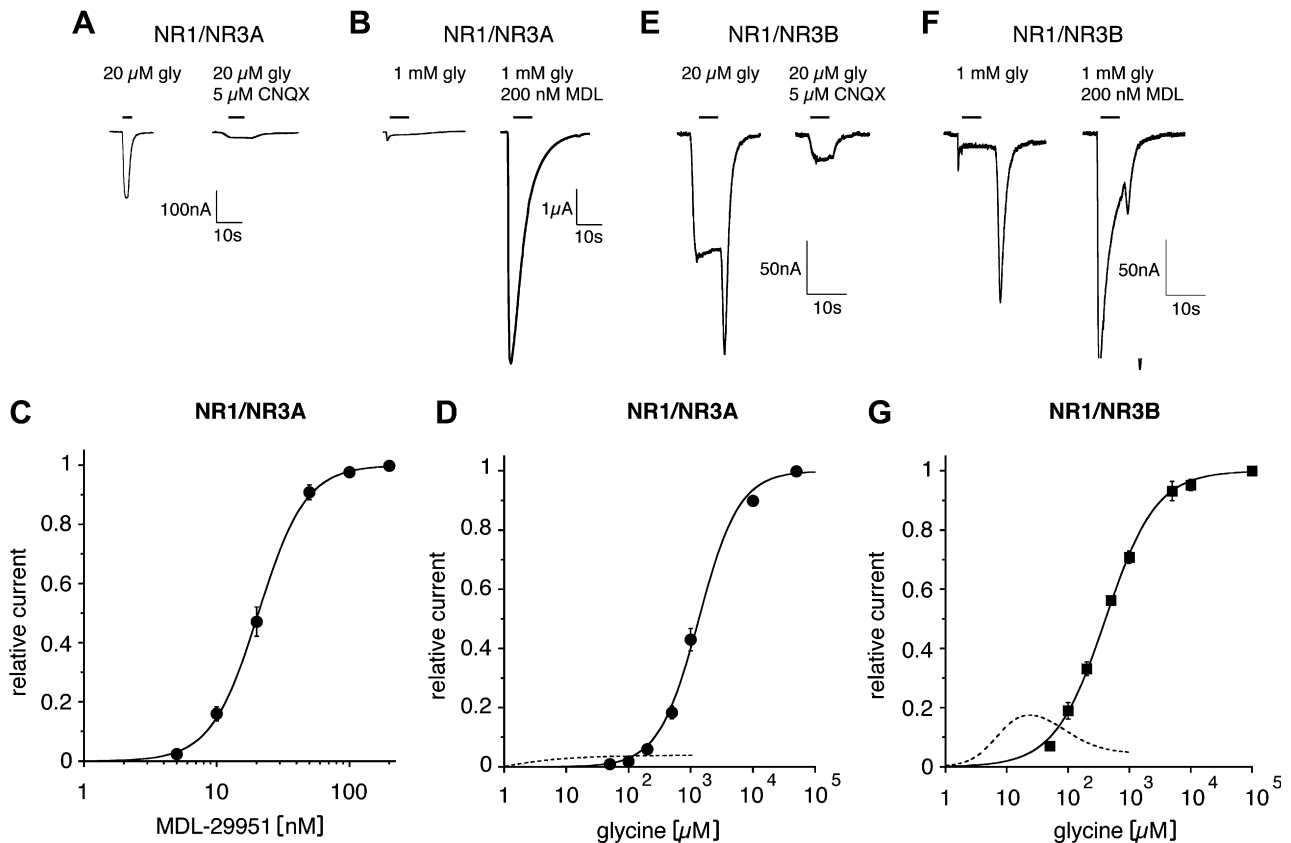


Fig. 2. Effects of glycine site antagonists on NR1/NR3 receptor currents. Glycine-induced currents of NR1/NR3A receptors were (A) inhibited by about 90% in the presence of CNQX, and (B) potentiated about 25-fold by MDL. (C) Dose-dependence of MDL potentiation of NR1/NR3A receptors in the presence of 500 μ M glycine (EC_{50} : 21 ± 1.7 nM, $n = 8$). (D) Glycine dose-response curve in the presence of 200 nM MDL (solid line; see Table 1). Data obtained without MDL (dotted line) are plotted as a relative ratio compared to those with MDL. (E) Glycine currents of NR1/NR3B receptors were inhibited by about 80% by 5 μ M CNQX, and (F) increased about 6-fold upon adding MDL. Note large rebound currents after glycine washout in the absence of antagonists (E, F). (G) Glycine dose-response curve of NR1/NR3B receptors in the presence (solid line) and absence (dotted line) of 0.2 μ M MDL. Error bars in C, D, G indicate SE.

cine currents resembling those seen with NR1/NR3 receptors in the presence of MDL (Fig. 3A and Table 1). However, the shift in apparent glycine affinities was less pronounced than compared to wt receptors in the presence of MDL (Fig. 3C and Table 1). Similar results were also obtained with the mutants NR1^{Q387A} and NR1^{K465E} (data not shown). Thus, both antagonizing and mutating the NR1 glycine-binding site results in similar potentiation of receptor currents.

Further analysis revealed that, in contrast to wt NR1/NR3 channels, the NR1^{F466A}/NR3A and NR1^{F466A}/NR3B receptors were not potentiated by 200 nM MDL. Increasing the MDL concentration to 5 μ M led to an inhibition of relative glycine-induced currents at both mutant receptors (Fig. 3B). Analogous effects were also obtained with L689 under identical conditions (data not shown). Thus, elevated concentrations of MDL and L689 also antagonize glycine binding to the NR3 subunit, which might explain the pronounced decrease in apparent glycine affinity seen with wt NR1/NR3 receptors upon MDL addition (Fig. 2D and G). Furthermore, negative cooperative interactions of the antagonist-occupied NR1 subunit with

NR3 might contribute to the variability of glycine EC_{50} values observed here.

To analyze the role of the NR3 subunit in channel activation, we mutated the NR3A-binding site residues R638, V797 and D844, which are homologous to positions of the NR1 subunit known to be crucial for glycine binding [3,13]. Co-expression of NR3A^{V797L} with NR1 generated small responses to 1 mM glycine that were modestly potentiated by MDL, whereas the NR3A^{R638K} and NR3A^{D844E} mutants failed to produce detectable glycine currents even in the presence of MDL or L689 (Fig. 3D). To investigate whether the non-functional NR3 subunits co-assemble with NR1, we affinity-purified wt and mutant NR1-His/NR3A^{R638K} and NR1-His/NR3A^{D844E} receptors from [³⁵S]methionine labelled oocytes. SDS-PAGE revealed that both mutant subunits were present in the purified receptor complexes at intensities comparable to those found in wt NR1/NR3A receptors (Fig. 3E). Hence, the loss of channel activity seen upon NR3A LBD substitutions is due to impaired glycine binding rather than altered subunit expression or assembly.

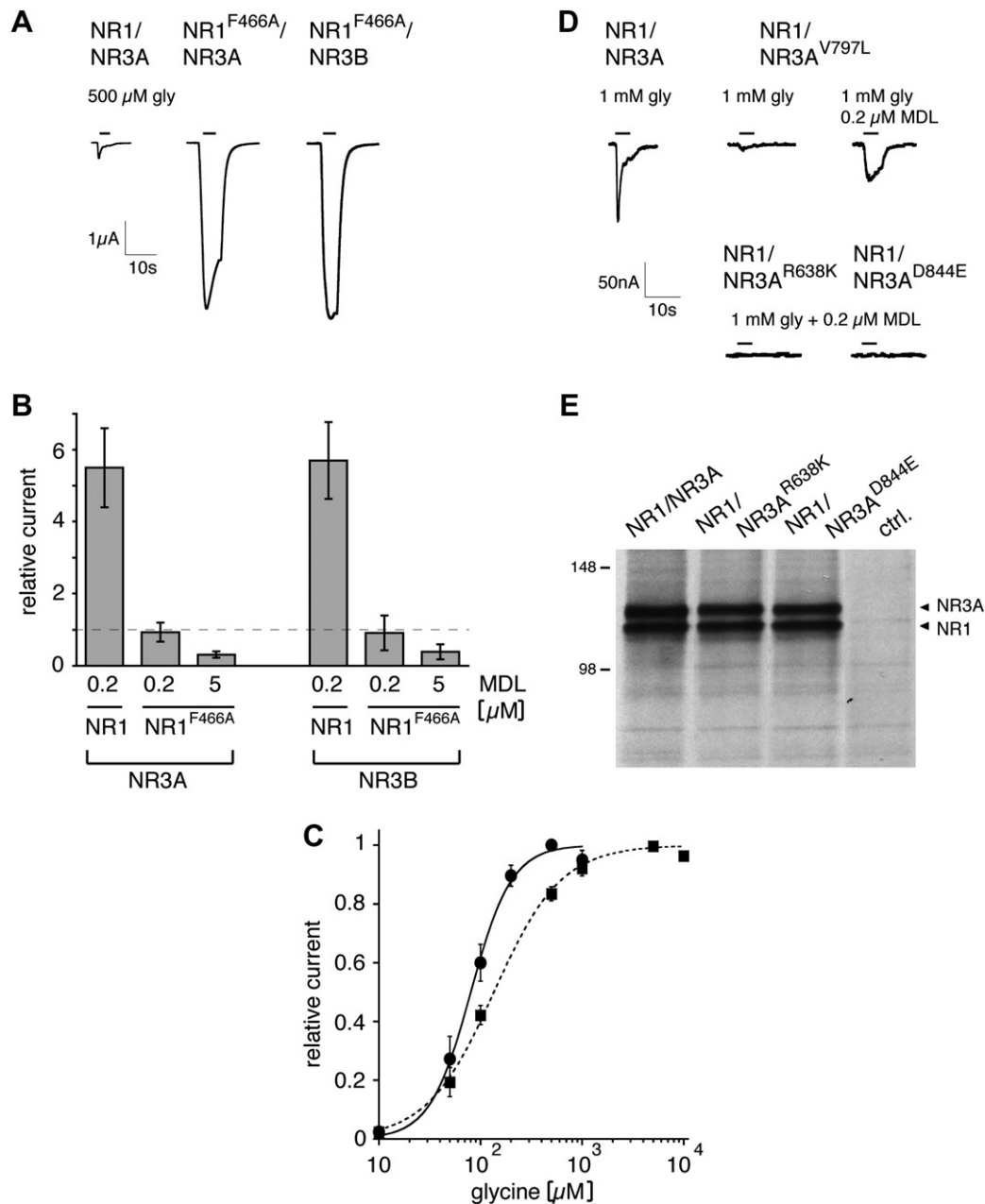


Fig. 3. Effects of NR1 and NR3 binding site mutations. (A) Mutant NR1^{F466A} increases maximal inducible glycine currents of NR1^{F466A}/NR3A and NR1^{F466A}/NR3B receptors. (B) Effects of MDL on currents elicited by 500 μM glycine. In contrast to NR1/NR3A and NR1/NR3B receptors, NR1^{F466A}/NR3A and NR1^{F466A}/NR3B receptors were not potentiated by 0.2 μM MDL (I_{rel} , 5.5 ± 1.1 and 5.7 ± 1.1 vs. 0.93 ± 0.26 and 0.91 ± 0.48 ; $n = 4$); 5 μM MDL even inhibited both mutant channels (I_{rel} , 0.31 ± 0.09 and 0.39 ± 0.21 ; $n = 4$). Dashed line represents normalized current values in the absence of MDL. (C) Glycine dose–response curves of NR1^{F466A}/NR3A (filled circles) and NR1^{F466A}/NR3B receptors (filled squares). (D) Mutations in the NR3A ligand binding site impair NR1/NR3A receptor function. In contrast to wt NR1/NR3A receptors, NR1/NR3A^{V797L} receptors were only marginally potentiated by MDL. NR1/NR3A^{R638K} and NR1/NR3A^{D844E} receptors were non-functional, although (E) similar amounts of receptor polypeptides were purified from ³⁵S-labelled oocytes, as revealed by SDS–PAGE. Error bars in B and C indicate SE.

Discussion

In this study, we present strong evidence for differential roles of the NR1 and NR3 subunits in excitatory glycine receptor function. Antagonists of or mutations within the glycine-binding site of the NR1 subunit produced large NR1/NR3 receptor currents, presumably by suppressing receptor desensitization. In contrast, antagonizing or

mutating the NR3-binding site resulted in a severe reduction or even complete loss of glycine responses. This is consistent with a pivotal role of the NR3 subunit in NR1/NR3 receptor activation.

Binding studies with soluble LBDs have shown that NR3 and NR1 subunits bind glycine with high and low affinity, respectively [10,12]. Based on the different glycine affinities, we propose that sequential occupation of the

NR3 and NR1 sites results in two separate effects on receptor function: first, activation of the ion channel by glycine binding to the high-affinity NR3 sites, and second, inhibition through glycine binding to the low-affinity NR1 sites. Hence, exposure to saturating glycine concentrations leads to transient, rapidly desensitizing receptor responses. Differential kinetics of glycine binding/unbinding to the NR3 and NR1 subunit would also explain the pronounced rebound effect seen after washout of glycine ([9]; this study), which likely reflects a slower rate of glycine dissociation from the NR3 LBD. Our concept of differential contributions of the two glycine-binding sites to distinct receptor conformational states (Fig. 4) is compatible with accepted models of ligand binding and channel activation in the iGluR family [14]. Accordingly, glycine binding to the NR3 subunits is thought to generate sufficient conformational strain within their LBDs to open the ion channel (Fig. 4A). Subsequent binding of glycine to the low-affinity NR1 sites would weaken interdomain interactions between the NR1 and NR3 LBDs (Fig. 4A), thereby allowing for rapid receptor desensitization [15]. This assumption is supported by our observation that the small and rapidly desensitizing glycine currents of NR1/NR3 receptors are potentiated and converted into barely desensitizing

steady-state currents by antagonists of or mutations within the NR1 glycine-binding site (Fig. 4B and C). In contrast, NR3 antagonists and mutations counteract receptor activation by interfering with NR3 LBD closure, which is essential for inducing channel opening (Fig. 4D).

Together with the model of NR1/NR3 receptor activation proposed above, our data suggest a unique role of glycine at NR3 subunit containing receptors. Excitatory glycine receptors matching the NR1/NR3 receptor pharmacology described here have so far not been found *in vivo*. This could be due to a pronounced desensitization of NR1/NR3 receptors by free glycine. In addition, the widespread use of the non-NMDA receptor antagonist CNQX might mask excitatory glycine currents. Although the existence of native NR1/NR3 receptors needs to be confirmed, incorporation of NR3 subunits into NR1/NR2 di-heteromeric receptors has been shown to result in a decrease in single channel conductance [16]. Based on the recently established NR1/NR2 dimer-of-dimer arrangement in NMDA receptors [17], we attribute the reduced agonist response of tri-heteromeric NR1/NR2/NR3 NMDA receptors to glycine-dependent silencing mediated by the NR1/NR3 dimer. We speculate that the opposite effects of glycine on the current responses of NR1/NR2 and NR1/NR3

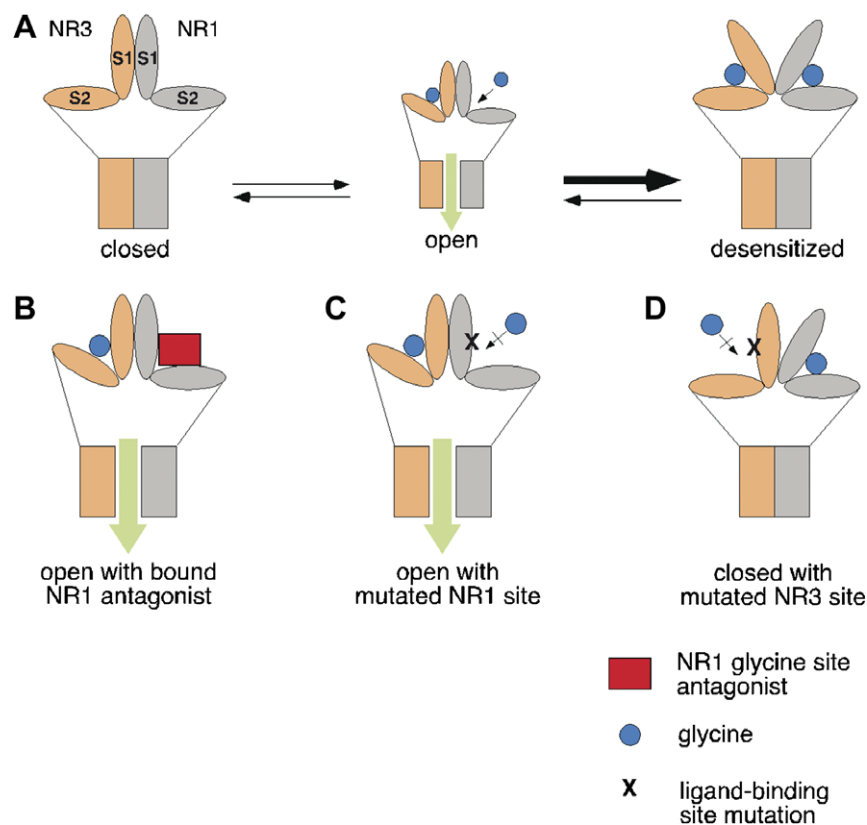


Fig. 4. Schematic model of NR1/NR3 receptor states. (A) Reaction scheme of NR1/NR3 receptor gating depicting the hetero-dimeric arrangement of the LBDs of the NR1 (grey) and NR3 (orange) subunits. Sequential occupation of the high- and low-affinity glycine sites of the NR3 and NR1 subunits results in channel opening (middle) followed by desensitization (right). (B–D) Differential effects of antagonists of and mutations within the NR1 and NR3 LBDs on channel function. (B) Binding of glycine to the NR3 subunit in the presence of an NR1 antagonist results in non-desensitizing channel opening. (C) Mutations affecting glycine binding to the NR1 LBD similarly lead to channel activation without desensitization. (D) In contrast, mutation of (or antagonist binding to, not shown) the LBD of NR3 results in an inactive or desensitized receptor. For clarity, only two subunits of the receptor are shown. (For color coding described in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

receptors reflect differences in the strength of LBD interactions between NR1/NR2 and NR1/NR3 dimers. Depending on the side-chains located at the interface formed by these LBD dimers, glycine binding would result in potentiation at conventional NR1/NR2 receptors, whereas at NR1/NR3 receptors it would cause rapid receptor deactivation. The different consequences of glycine binding to NR1/NR2 and NR1/NR3 dimers might reflect evolutionary adaptation of channel gating to particular physiological conditions.

Acknowledgments

We thank Drs. Sucher and Zhang for providing the NR3 clones. This study was supported by the Max-Planck-Gesellschaft, Dr. Robert Pflieger Stiftung (B.L.), Hertie-Stiftung (B.L.), DFG (LA 1086/4-1, B.L.), and Fonds der Chemischen Industrie (H.B.). C.M. holds a fellowship from the Graduiertenkolleg “Neuronale Plastizität”.

References

- [1] S.G. Cull-Candy, D.N. Leszkiewicz, Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses, *Sci. STKE* 19 (2004) 255, re16.
- [2] J.W. Johnson, P. Ascher, Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons, *Nature* 325 (1987) 529–531.
- [3] A. Kuryatov, B. Laube, H. Betz, J. Kuhse, Mutational analysis of the glycine-binding site of the NMDA receptor: structural similarity with bacterial amino acid-binding proteins, *Neuron* 12 (1994) 1291–1300.
- [4] B. Laube, H. Hirai, M. Sturgess, H. Betz, J. Kuhse, Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit, *Neuron* 18 (1997) 450–493.
- [5] H. Furukawa, E. Gouaux, Mechanisms of activation, inhibition and specificity: crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core, *EMBO J.* 22 (2003) 2873–2885.
- [6] R. Dingledine, K. Borges, D. Bowie, S.F. Traynelis, The glutamate receptor ion channels, *Pharmacol. Rev.* 51 (1999) 7–61.
- [7] N.J. Sucher, S. Akbarian, C.L. Chi, C.L. Leclerc, M. Awobuluyi, D.L. Deitcher, M.K. Wu, J.P. Yuan, E.G. Jones, S.A. Lipton, Developmental and regional expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDAR-L) in the rodent brain, *J. Neurosci.* 15 (1995) 6509–6520.
- [8] M. Nishi, H. Hinds, H.P. Lu, M. Kawata, Y. Hayashi, Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner, *J. Neurosci.* 21 (2001) RC185.
- [9] J.E. Chatterton et al., Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits, *Nature* 415 (2002) 793–797.
- [10] Y. Yao, M.L. Mayer, Characterization of a soluble ligand binding domain of the NMDA receptor regulatory subunit NR3A, *J. Neurosci.* 26 (2006) 4559–4566.
- [11] S. Sadtler, B. Laube, A. Lashub, A. Nicke, H. Betz, G. Schmalzing, A basic cluster determines topology of the cytoplasmic M3-M4 loop of the glycine receptor $\alpha 1$ subunit, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 16782–16790.
- [12] A. Ivanovic, H. Reilander, B. Laube, J. Kuhse, Expression and initial characterization of a soluble glycine binding domain of the *N*-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 19933–19937.
- [13] H. Hirai, J. Kirsch, B. Laube, H. Betz, J. Kuhse, The glycine binding site of the *N*-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1: identification of novel determinants of co-agonist potentiation in the extracellular M3-M4 loop region, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 6031–6036.
- [14] M.L. Mayer, Glutamate receptors at atomic resolution, *Nature* 440 (2006) 456–462.
- [15] N. Armstrong, J. Jasti, M. Beich-Frandsen, E. Gouaux, Measurement of conformational changes accompanying desensitization in an ionotropic glutamate receptor, *Cell* 127 (2006) 85–97.
- [16] S. Das et al., Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A, *Nature* 393 (1998) 377–381.
- [17] H. Furukawa, S.K. Singh, R. Mancusso, E. Gouaux, Subunit arrangement and function in NMDA receptors, *Nature* 438 (2005) 185–192.

Supralinear potentiation of NR1/NR3A excitatory glycine receptors by Zn^{2+} and NR1 antagonist

Christian Madry*, Heinrich Betz*[†], Jörg R. P. Geiger*[§], and Bodo Laube*^{§†}

*Department of Neurochemistry and [†]Hertie Research Group, Max Planck Institute for Brain Research, Deutschordenstrasse 46, 60528 Frankfurt am Main, Germany; and [§]Department of Molecular and Cellular Neurophysiology, Technical University Darmstadt, Schnittspahnstrasse 3, 64287 Darmstadt, Germany

Communicated by Jean-Pierre Changeux, Institut Pasteur, Paris, France, June 12, 2008 (received for review April 11, 2008)

Coassembly of the glycine-binding NMDA receptor subunits NR1 and NR3A results in excitatory glycine receptors of low efficacy. Here, we report that micromolar concentrations of the divalent cation Zn^{2+} produce a 10-fold potentiation of NR1/NR3A receptor responses, which resembles that seen upon antagonizing glycine binding to the NR1 subunit. Coapplication of both Zn^{2+} and NR1 antagonist caused a supralinear potentiation, resulting in a >120-fold increase of glycine-activated currents. At concentrations >50 μM , Zn^{2+} alone generated receptor currents with similar efficacy as glycine, implying that NR1/NR3A receptors can be activated by different agonists. Point mutations in the NR1 and NR3A glycine-binding sites revealed that both the potentiating and agonistic effects of Zn^{2+} are mediated by the ligand-binding domain of the NR1 subunit. In conclusion, Zn^{2+} acts as a potent positive modulator and agonist at the NR1 subunit of NR1/NR3A receptors. Our results suggest that this unconventional member of the NMDA receptor family may *in vivo* be gated by the combined action of glycine and Zn^{2+} or a yet unknown second ligand.

binding site | ligand-gated ion channel | NMDA receptor | zinc

N-methyl-D-aspartate receptors represent a complex family of the tetrameric ionotropic glutamate receptors that have attracted substantial interest because of their unique pharmacology and role in synaptic plasticity and memory formation (1, 2). The diversity of NMDA receptor subtypes derives from a multitude of receptor subunits, which are encoded by seven different genes that have been classified into three subfamilies (NR1, NR2A–D, and NR3A and NR3B) (3). Each subunit shares a common modular design characterized by the extracellular (i) N-terminal domain (NTD), (ii) the S1S2 ligand binding domain (LBD), (iii) an intramembrane region that forms the ion channel, and (iv) an extended intracellular C-terminal tail (4).

Conventional NMDA receptors are composed of two glycine-binding NR1 subunits and two glutamate-binding NR2 subunits each (5) and are efficiently activated upon simultaneous binding of both glutamate and glycine (6). Coexpression of the glycine-binding NR3A or NR3B subunit with NR1 and NR2 subunits generates heteromeric receptors composed of NR1, NR2, and NR3 subunits, which also require glutamate and glycine for gating but exhibit altered biophysical properties (7–10). In contrast, recombinant NMDA receptors assembled from two NR1 and two NR3 subunits (11) do not respond to glutamate but are exclusively activated by glycine (“excitatory glycine receptors”; ref. 12). The glycine currents produced by these NR1/NR3 receptors are, however, rather small, although assembly and surface insertion occur with similar efficiency as that of conventional NR1/NR2 receptors (13). Recently, antagonists of the NR1 glycine-binding site were found to markedly enhance the glycine responses of NR1/NR3 receptors (13, 14), presumably by preventing rapid receptor desensitization caused by glycine binding to the NR1 subunit.

An important endogenous modulator of conventional NMDA receptors is the divalent cation Zn^{2+} , which allosterically inhibits NR1/NR2 receptors in the submicromolar to micromolar concentration range (15–17). Here, we examined whether Zn^{2+} also

affects the glycine-induced currents of heteromeric NR1/NR3A receptors. NR3A subunit containing NMDA receptors have been implicated in the regulation of dendritic spine density (7) and in myelination processes by oligodendrocytes (18–21); hence, their pharmacology has gained considerable attention. We report that Zn^{2+} acts as both a potent positive modulator and agonist of NR1/NR3A receptors via the LBD of the NR1 subunit. Combining Zn^{2+} with an NR1 glycine-binding site antagonist resulted in a >120-fold supralinear potentiation of glycine-induced currents. Our results suggest that, similar to NR1/NR2 receptors, native NR1/NR3A receptors may be activated by a combination of two ligands.

Results

Zn^{2+} Potentiates Glycine-Induced Currents and Acts as an Agonist at Recombinant NR1/NR3A Receptors. To investigate whether Zn^{2+} modulates the function of NR1/NR3A receptors, we analyzed the effect of extracellularly applied Zn^{2+} on glycine-induced currents recorded from *Xenopus* oocytes expressing the NR1 and NR3A subunits. Peak-inward currents of NR1/NR3A receptors elicited by saturating glycine concentrations (100 μM) were strongly potentiated by micromolar concentrations of Zn^{2+} when applied before the agonist (half-maximal potentiation at $10.5 \pm 1.2 \mu\text{M}$, $n = 7$; Fig. 1A). Maximal potentiation (≈ 10 -fold) was seen at 50 μM followed by an attenuation of the Zn^{2+} effect (Fig. 1A). The apparent affinity of glycine was not changed in the presence of 50 μM Zn^{2+} (Table 1), suggesting that glycine and Zn^{2+} act at different sites. At higher concentrations of Zn^{2+} , we observed a substantial activation of NR1/NR3A receptors in the absence of glycine; the EC_{50} value for this Zn^{2+} activation was $178 \pm 16 \mu\text{M}$ (Fig. 1B and Table 1). The maximal inducible currents (I_{max}) elicited by glycine and Zn^{2+} were found to be similar (Fig. 1B; glycine I_{max} : $0.23 \pm 0.05 \mu\text{A}$ vs. Zn^{2+} I_{max} : $0.21 \pm 0.05 \mu\text{A}$; $n = 6$; $P > 0.05$, paired Student's *t* test), although glycine displayed a >25-fold higher apparent affinity than Zn^{2+} (Table 1). At a Zn^{2+} concentration generating maximal current responses (1 mM), preapplication of a nonactivating concentration of glycine ($\leq 1 \mu\text{M}$) enhanced the Zn^{2+} response by ≈ 1.4 -fold, indicating that glycine is only a weak modulator of Zn^{2+} -induced currents [supporting information (SI) Fig. S1]. In summary, at the lower micromolar range, Zn^{2+} is a potent positive modulator of glycine-induced NR1/NR3A currents, whereas at higher concentrations, Zn^{2+} acts as an agonist.

NR1 Glycine Site Antagonist Potentiates Zn^{2+} -Activated Currents. Previously, competitive antagonists of the NR1 glycine-binding site have been shown to produce a similar potentiation of

Author contributions: H.B., J.R.P.G., and B.L. designed research; C.M. performed research; C.M. and J.R.P.G. analyzed data; and C.M., H.B., J.R.P.G., and B.L. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

[†]To whom correspondence should be addressed. E-mail: neurochemie@mpih-frankfurt.mpg.de.

[§]J.R.P.G. and B.L. contributed equally to this work.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0805624105/DCSupplemental.

© 2008 by The National Academy of Sciences of the USA

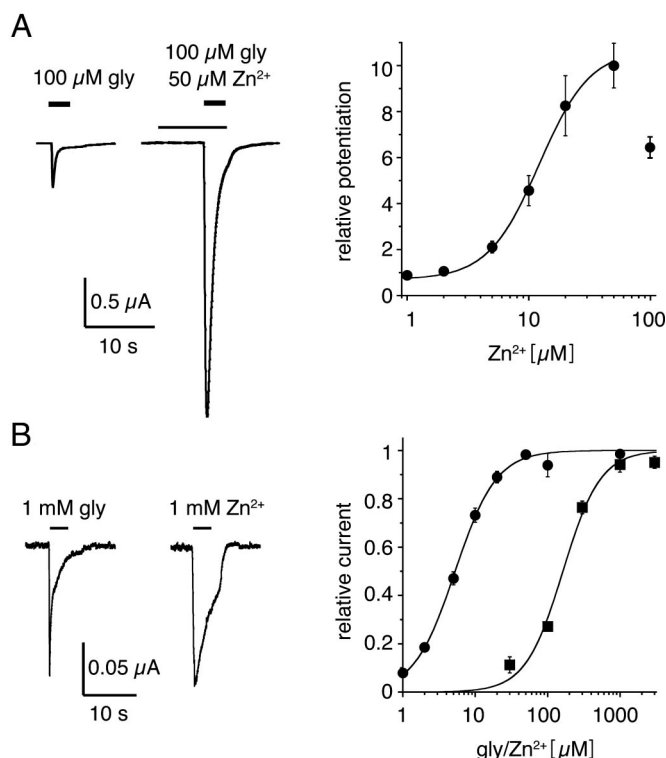


Fig. 1. Zn^{2+} potentiates glycine-induced currents and acts as a full agonist at recombinant NR1/NR3A receptors. (A) (Left) NR1/NR3A-mediated currents evoked by a saturating concentration ($100\ \mu\text{M}$) of glycine in the absence and presence of $50\ \mu\text{M}\ \text{Zn}^{2+}$. (Right) Relative potentiation of the saturating glycine response ($100\ \mu\text{M}$) by micromolar concentrations of Zn^{2+} ($n = 7$). Note the steep slope of the Zn^{2+} dose response, reaching a peak at $50\ \mu\text{M}\ \text{Zn}^{2+}$. (B) (Left) Current traces measured from the same cell showed comparable responses upon addition of $1\ \text{mM}$ glycine and $1\ \text{mM}\ \text{Zn}^{2+}$. (Right) Dose-response analyses revealed a >25 -fold lower apparent Zn^{2+} affinity (squares, $n = 8$) compared with glycine (circles, $n = 7$). Note that at $1\ \text{mM}$, both glycine and Zn^{2+} responses are saturated.

glycine-induced NR1/NR3A currents as seen here with 50 μM Zn^{2+} (Fig. 2*A*; see also refs. 13, 14). We therefore examined whether MDL-29951 (MDL), a potent antagonist of the NR1 glycine site, affects Zn^{2+} -induced currents. Preapplication with a concentration of MDL that saturates the glycine binding site located on the NR1 LBD (0.2 μM ; ref. 13) resulted in a pronounced potentiation of the current elicited by 1 mM Zn^{2+} (7.5-fold; Fig. 2*A* and *B* and Table 1). This potentiation was, however, lower than that seen with glycine-induced currents (24.2-fold; Fig. 2*A* and *B* and Table 1). In contrast to the potentiation of glycine-mediated currents by MDL, which is

accompanied by a 200-fold reduction in the apparent affinity of glycine (13), the presence of 0.2 μ M MDL had only a minor effect on the Zn^{2+} dose-response of ion channel activation (Fig. 2C and Table 1). In summary, the NR1 glycine-binding site antagonist MDL enhances both Zn^{2+} - and glycine-induced currents of NR1/NR3A receptors, but MDL potentiation seems to affect glycine and Zn^{2+} affinities differentially.

Supralinear Potentiation of Glycine-Induced Currents by Combined Preapplication of both MDL and Zn^{2+} . To examine whether the effects of Zn^{2+} and MDL are independent of each other, we coapplied 0.2 μM MDL and 100 μM Zn^{2+} to NR1/NR3A-expressing oocytes before exposure to a saturating glycine concentration (10 mM). This resulted in a >120-fold potentiation of the basal glycine current ($\approx 6 \mu\text{A}$ vs. 40 nA; Fig. 2*A* and *B* and Table 1), that is, current values much larger than the sum of the individual responses obtained with glycine and MDL and glycine and Zn^{2+} , respectively. This supralinear potentiation suggests that positive interactions between the Zn^{2+} and MDL binding sites boost NR1/NR3A receptor activation by glycine. The apparent glycine affinity seen under these conditions closely resembled that obtained in the presence of MDL alone (Fig. 2*C* and Table 1). This confirms that Zn^{2+} has no effect on apparent glycine affinity and supports the idea that the potentiating effects of Zn^{2+} and MDL on glycine currents are mediated by different binding sites. In summary, NR1/NR3A-mediated currents are supralinearly potentiated by the two modulatory ligands, which, together, generate receptors of high efficacy. The >120-fold potentiation disclosed here implies that activation of the receptor by either glycine or Zn^{2+} alone proceeds only with rather low efficacy, whereas potentiation by a single positive modulator results in receptors of intermediate efficacy.

Zn²⁺ Potentiation and Activation of NR1/NR3A Receptors Does Not Require the Extracellular NTDs. Allosteric Zn²⁺ inhibition of conventional NR1/NR2A and NR1/NR2B receptors is thought to be mediated via the NTD of the NR2 subunit (17, 22, 23). To examine whether the NTD is also important for Zn²⁺ modulation of NR1/NR3A receptors, we generated a NR3A subunit lacking the entire NTD (Fig. S2) and coexpressed it with a similarly NTD-deleted NR1 subunit (23). The resulting NR1^{ΔNTD}/NR3A^{ΔNTD} receptors were found to be fully functional with a slightly lower apparent affinity for glycine than the WT receptor (Fig. 3A and Table S1). Zn²⁺ activation of the NR1^{ΔNTD}/NR3A^{ΔNTD} receptors also displayed a reduced apparent affinity (EC₅₀ >3 mM Zn²⁺; Fig. 3A and Table 1) compared with WT NR1/NR3A receptors (EC₅₀ = 178 ± 16 μM). Similarly, Zn²⁺ increased the glycine currents of the truncated receptor maximally ≈3-fold (Fig. 3A and Table S1), but half-maximal potentiation was seen at approximately 25-fold higher concentrations (287 ± 18 μM vs. 10.5 ± 1.2 μM; Table S1). Also, MDL produced a potentiation of saturating glycine currents

Table 1. Pharmacology of NR1/NR3A receptors

Application of	EC ₅₀ , μM	Hill coefficient	Relative potentiation*
Glycine	6.5 \pm 1.2	1.5 \pm 0.06	1
50 μM Zn ²⁺ + glycine	7.2 \pm 0.2	2.1 \pm 0.03	9.8 \pm 1 [†]
0.2 μM MDL + glycine	1444 \pm 200	1.4 \pm 0.06	24.2 \pm 2.1 [†]
0.2 μM MDL / 50 μM Zn ²⁺ + glycine	1360 \pm 200	1.3 \pm 0.1	122 \pm 8 [‡]
Zn ²⁺	178 \pm 16	1.8 \pm 0.2	1
0.2 μM MDL + Zn ²⁺	298 \pm 17	1.9 \pm 0.1	7.5 \pm 0.3 [§]

*As compared with glycine or Zn^{2+} alone ($n = 4-12$).

[†]Determined at 100 μ M glycine.[‡]Determined at 10 mM glycine.

[§]Determined at 1 mM glycine.

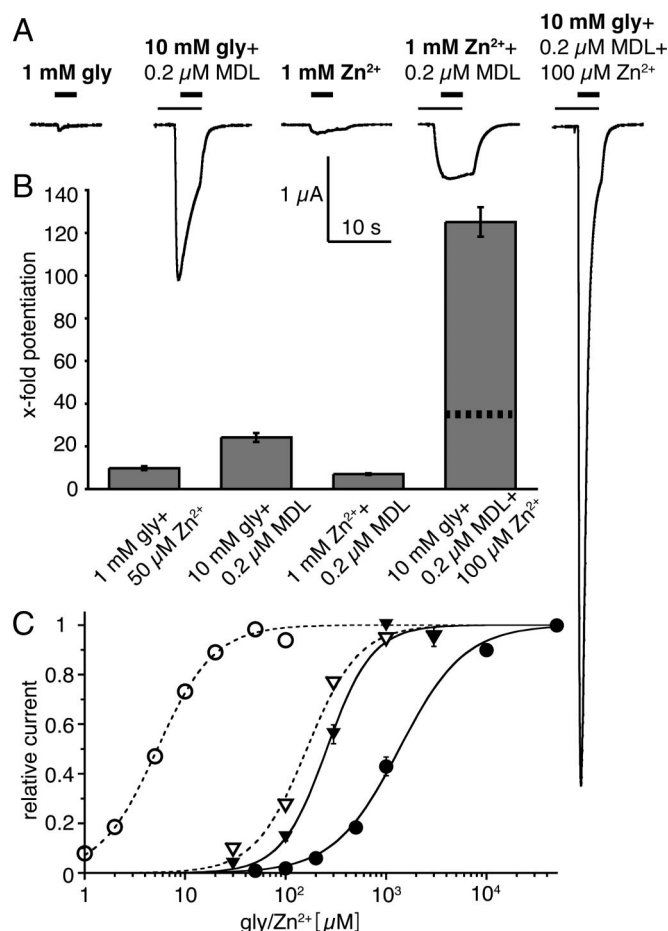


Fig. 2. Supralinear potentiation of glycine-activated currents by combined application of Zn^{2+} and the NR1 antagonist MDL. (A) Single traces of NR1/NR3A receptors illustrate the potentiation of saturating glycine and Zn^{2+} currents by 0.2 μ M MDL-29951 (left four traces). Preapplication with 100 μ M Zn^{2+} and 0.2 μ M MDL resulted in a supralinear increase of the current evoked by saturating glycine concentrations (right trace). Note identical scale shown for all traces. (B) Quantitative paired analysis of the mean I_{max} for the conditions shown in A plotted as x-fold potentiation compared with the I_{max} of glycine alone ($n = 6$ each). The dotted line in the extreme right bar corresponds to the arithmetic sum of MDL- and Zn^{2+} -potentiated glycine currents. (C) Differential effects of MDL on apparent agonist affinities. Whereas MDL decreased the apparent glycine affinity by two orders of magnitude [glycine alone (open circles) vs. glycine with 0.2 μ M MDL (closed circles); $n = 6$ each], the affinity of Zn^{2+} was only slightly reduced in the presence of MDL [Zn^{2+} alone (open triangles) vs. Zn^{2+} plus 0.2 μ M MDL (closed triangles); $n = 5$ each].

comparable to that seen with WT NR1/NR3A receptors (Fig. 3A). Furthermore, coapplication of Zn^{2+} and MDL led to a supralinear increase of the glycine response (Fig. 3A and Table S1). In summary, deletion of the NR1 and NR3A NTDs changed the affinities of the agonists and the extent of modulation by Zn^{2+} , MDL, or a combination of both modulators. However, the NTD deletions prevented neither activation nor modulation by Zn^{2+} . We therefore conclude that NR1^{ΔNTD}/NR3A^{ΔNTD} receptors still harbor the agonistic and positive modulatory binding sites through which Zn^{2+} gates and potentiates NR1/NR3A NMDA receptors.

Agonistic Effects of Glycine and Zn^{2+} Are Mediated by Distinct Binding Sites Located on the NR3A and NR1 LBDs. The results described above indicate that the agonistic binding sites of glycine and Zn^{2+} are distinct and not localized on the NTDs. To further corroborate this conclusion, we analyzed Zn^{2+} activation of a

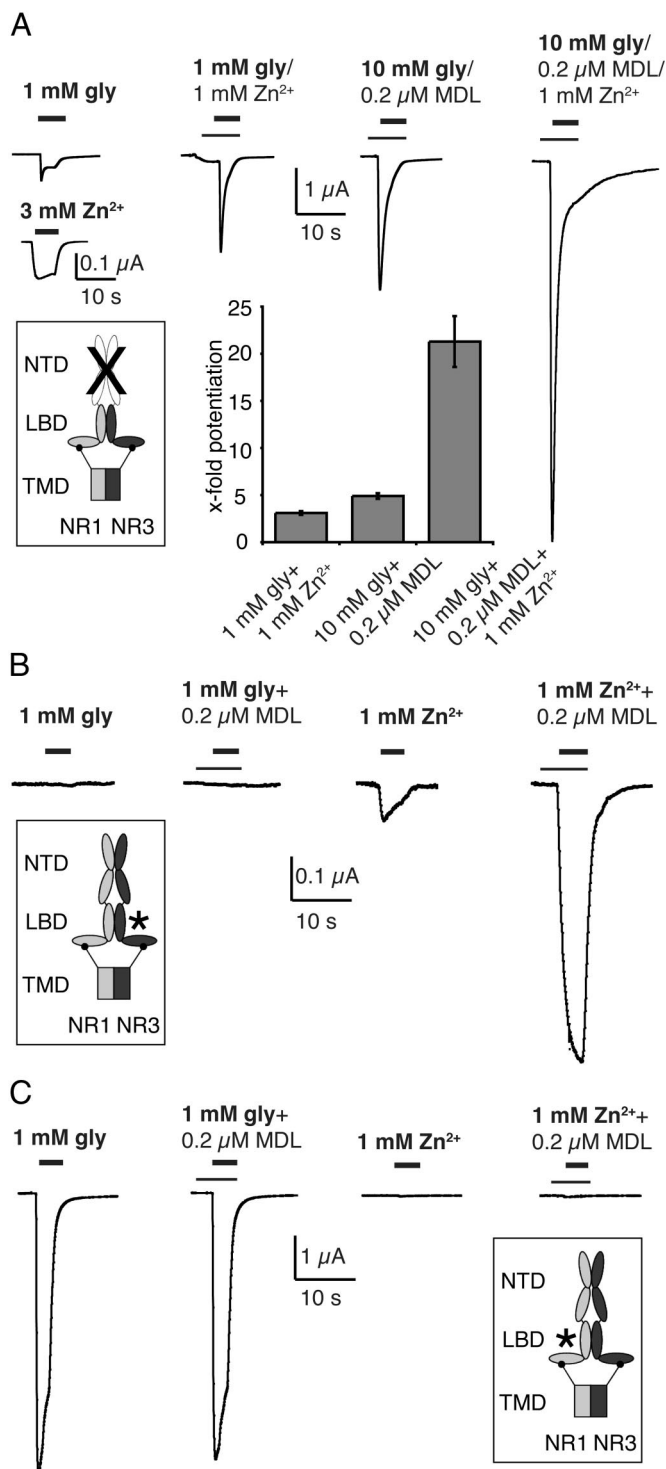
mutant receptor in which glycine binding to the ligand-binding domain of the NR3A subunit is abolished (NR3A^{D844E}; Fig. S2), and which hence cannot be activated by glycine (13). In contrast, Zn^{2+} activated the NR1/NR3A^{D844E} receptor with an apparent affinity and efficacy similar to that found with the WT NR1/NR3A channel (Fig. 3B). Furthermore, currents elicited by saturating Zn^{2+} concentrations (1 mM) were still potentiated by MDL (≈ 9 -fold), whereas glycine failed to produce any detectable currents even in the presence of MDL or Zn^{2+} (Fig. 3B and data not shown).

We also examined a similar substitution in the glycine-binding site of the NR1 LBD (NR1^{F466A}; Fig. S2; refs. 13, 24), which has been shown to mimic the pharmacological effects of MDL on glycine currents (Fig. 3C). Here, Zn^{2+} with or without MDL was not able to elicit any currents at the NR1^{F466A}/NR3A receptor (Fig. 3C). In addition, Zn^{2+} failed to potentiate the glycine current of this mutant receptor (data not shown). Thus, the sites important for Zn^{2+} activation and Zn^{2+} potentiation involve structural elements of the NR1 LBD. Consistent with these findings, preapplication of glycine to WT NR1/NR3A receptors at concentrations ≥ 10 μ M prevented further activation upon the addition of 1 mM Zn^{2+} (Fig. S1). This is likely to reflect desensitization of the receptor by the preapplied glycine (13, 14). In summary, NR1/NR3A receptors can be activated by Zn^{2+} via the NR1 LBD and by glycine via the NR3A LBD, indicating that receptor activation can proceed via distinct subunit-specific pathways.

Discussion

Here, we show that Zn^{2+} acts as both a potent positive modulator and an agonist at NR1/NR3A NMDA receptors. Coapplication of Zn^{2+} and the NR1 glycine site antagonist MDL resulted in a >120 -fold increase of glycine-activated currents, which implies that these ligands bind at sites that interact cooperatively. Furthermore, this supralinear potentiation indicates that glycine alone activates NR1/NR3A receptors only with low efficacy. Mutational analysis revealed that receptor modulation and activation by Zn^{2+} are mediated by the LBD of the NR1 subunit, whereas the NR3A LBD is required for receptor activation by glycine. Together, these results demonstrate that the ligand-binding sites localized on the NR1 and NR3A subunits can act in concert to cause efficient channel opening.

Supralinear Potentiation of NR1/NR3A Receptors. A major finding of this study is that the activation of NR1/NR3A receptors can be achieved along different routes toward channel opening. In Fig. 4, we present an attempt to formalize the different modulatory and gating reactions that have been observed with these receptors. Accordingly, low micromolar concentrations of Zn^{2+} lead to an up to 10-fold potentiation of glycine-activated currents. Likewise, the NR1 glycine site antagonist MDL similarly enhances ion flux irrespective of whether glycine or Zn^{2+} is used as an agonist. Simultaneous application of both Zn^{2+} and MDL results neither in occlusion of the weaker component nor in pure summation of both potentiations but generates a supralinear >120 -fold increase of the glycine-activated current (Fig. 4). This indicates that the underlying modulatory mechanisms are not identical; rather Zn^{2+} and MDL enhance receptor efficacy in a highly cooperative manner. To our knowledge, the effective supralinear potentiation of NR1/NR3A receptors described here represents a unique feature in ligand-gated ion channel physiology that might be exploited for studying mechanisms underlying the cooperativity of multiple modulators. More importantly, this unusual extent of potentiation might provide an explanation for the limited success in demonstrating NR1/NR3A receptor activation *in vivo*. Whether coapplication of Zn^{2+} and an NR1 antagonist might offer a strategy for facilitating the



8. Perez-Otano I, et al. (2001) Assembly with the NR1 subunit is required for surface expression of NR3A-containing NMDA receptors. *J Neurosci* 21:1228–1237.
9. Matsuda K, Fletcher M, Kamiya Y, Yuzaki M (2003) Specific assembly with the NMDA receptor 3B subunit controls surface expression and calcium permeability of NMDA receptors. *J Neurosci* 5:10064–10073.
10. Tong G, et al. (2008) Modulation of NMDA receptor properties and synaptic transmission by the NR3A subunit in mouse hippocampal and cerebrocortical neurons. *J Neurophysiol* 99:122–132.
11. Schuler T, Mesic I, Madry C, Bartholomäus I, Laube B (2008) Formation of NR1/NR2 and NR1/NR3 heterodimers constitutes the initial step in *N*-methyl-D-aspartate receptor assembly. *J Biol Chem* 283:37–46.
12. Chatterton JE, et al. (2002) Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* 415:793–797.
13. Madry C, et al. (2007a) Principal role of NR3 subunits in NR1/NR3 excitatory glycine receptor function. *Biochem Biophys Res Commun* 354:102–108.
14. Awobuluyi M, et al. (2007) Subunit-specific roles of glycine-binding domains in activation of NR1/NR3 *N*-methyl-D-aspartate receptors. *Mol Pharmacol* 71:112–122.
15. Paoletti P, Ascher P, Neyton J (1997) High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. *J Neurosci* 17:5711–5725.
16. Zheng F, et al. (2001) Allosteric interaction between the amino terminal domain and the ligand binding domain of NR2A. *Nat Neurosci* 4:894–901.
17. Rachline J, Perin-Dureau F, Le Goff A, Neyton J, Paoletti P (2005) The micromolar zinc-binding domain on the NMDA receptor subunit NR2B. *J Neurosci* 25:308–317.
18. Stys PK, Lipton SA (2007) White matter NMDA receptors: an unexpected new therapeutic target? *Trends Pharmacol Sci* 28:561–566.
19. Káradóttir R, Cavelier P, Bergersen LH, Attwell D (2005) NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia. *Nature* 22:1162–1166.
20. Salter MG, Fern R (2005) NMDA receptors are expressed in developing oligodendrocyte processes and mediate injury. *Nature* 438:1167–1171.
21. Micu I, et al. (2006) NMDA receptors mediate calcium accumulation in myelin during chemical ischaemia. *Nature* 439:988–992.
22. Paoletti P, et al. (2000) Molecular organization of a zinc binding N-terminal modulatory domain in a NMDA receptor subunit. *Neuron* 28:911–925.
23. Madry C, Mesic I, Betz H, Laube B (2007b) The N-terminal domains of both NR1 and NR2 subunits determine allosteric Zn²⁺ inhibition and glycine affinity of *N*-methyl-D-aspartate receptors. *Mol Pharmacol* 72:1535–1544.
24. Kuryatov A, Laube B, Betz H, Kuhse J (1994) Mutational analysis of the glycine-binding site of the NMDA receptor: structural similarity with bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron* 12:1291–1300.
25. Yao Y, Mayer ML (2006) Characterization of a soluble ligand binding domain of the NMDA receptor regulatory subunit NR3A. *J Neurosci* 26:4559–4566.
26. Stoll L, et al. (2007) Differential regulation of ionotropic glutamate receptors. *Biophys J* 92:1343–1349.
27. Changeux JP, Edelstein SJ (1998) Allosteric receptors after 30 years. *Neuron* 21:959–980.
28. Miller PS, Da Silva HM, Smart TG (2005) Molecular basis for zinc potentiation at strychnine-sensitive glycine receptors. *J Biol Chem* 280:37877–37884.
29. Le Novère N, Grutter T, Changeux JP (2002) Models of the extracellular domain of the nicotinic receptors and of agonist- and Ca²⁺-binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:3210–3215.
30. Mayer ML (2006) Glutamate receptors at atomic resolution. *Nature* 440:456–462.
31. Frederickson CJ, et al. (2006) Synaptic release of zinc from brain slices: factors governing release, imaging, and accurate calculation of concentration. *J Neurosci Methods* 154:19–29.
32. Hirzel K, et al. (2006) Hyperekplexia phenotype of glycine receptor alpha1 subunit mutant mice identifies Zn²⁺ as an essential endogenous modulator of glycinergic neurotransmission. *Neuron* 52:679–690.
33. Furukawa H, Singh SK, Mancusso R, Gouaux E (2005) Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* 438:185–192.
34. Mueller HT, Meador-Woodruff JH (2004) NR3A NMDA receptor subunit mRNA expression in schizophrenia, depression and bipolar disorder. *Schizophr Res* 71:361–370.
35. Henson MA, et al. (2008) Developmental regulation of the NMDA receptor subunits, NR3A and NR1, in human prefrontal cortex. *Cereb Cortex*. doi:10.1093.
36. Laube B, et al. (1995) Modulation by zinc ions of native rat and recombinant human inhibitory glycine receptors. *J Physiol* 483:613–619.

7. Kongressbeiträge zum Thema der Dissertation

- Juli 2006 5th Forum of the Federation of European Neuroscience Societies (FENS) in Wien, Österreich. Posterpräsentation zu „*Functional consequences of amino-terminal domain (NTD)-deleted NMDA receptor subunits*” Christian Madry, Bodo Laube and Heinrich Betz
- Nov. 2006 Society for Neuroscience 36th Annual Meeting in Atlanta, GA., U.S.A. Posterpräsentation zu „*Functional consequences of amino-terminal domain (NTD)-deleted NMDA receptor subunits*” Christian Madry, Ivana Mesic, Bodo Laube and Heinrich Betz
- Okt. 2007 Vortrag zum Thema "*Functional characterization of the excitatory NR1/NR3 glycine receptor*" im Rahmen des Symposiums der Russischen Akademie der Wissenschaften und der Alexander-von-Humboldt-Stiftung: "Neuroreceptors: structure, mechanism of action and role in pathologies", Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moskau, Russland
- Nov. 2007 Society for Neuroscience 37th Annual Meeting in San Diego, CA., U.S.A. Posterpräsentation zu „*Functional roles of the N-terminal domains of the NMDA receptor subunits NR1 and NR3 in excitatory glycine receptor function*” Christian Madry, Ivana Mesic, Heinrich Betz and Bodo Laube

Mein besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Heinrich Betz für die Möglichkeit an diesem Dissertationsthema in seiner Abteilung arbeiten zu können, für seine stete Diskussionsbereitschaft, für seinen unerschöpflichen Enthusiasmus für die Wissenschaft und sein Bedürfnis, diesen auf seine Mitarbeiter zu übertragen sowie für die kontinuierliche Unterstützung meiner Arbeit in allen Belangen.

Herrn Prof. Dr. Theo Dingermann danke ich für die Bereitschaft, meine Dissertation im Fachbereich Pharmazie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt mit zu betreuen.

Herrn PD Dr. Bodo Laube möchte ich herzlichst für die direkte fachliche Betreuung meiner Arbeit danken, für die Begeisterung zu diesem Thema, für seine unermüdliche Bereitschaft zu wissenschaftlichen Diskussionen an Ort und Stelle sowie für seine ruhige und stets positive Ausstrahlung, die zu einer sehr angenehmen und konzentrierten Arbeitsatmosphäre beigetragen hat.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Jörg R. P. Geiger, der durch unzählige Diskussionen und Anregungen maßgeblich zu einem guten Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat, sehr engagiert war, sein fundiertes Fachwissen anderen zu vermitteln und durch seine offene und optimistische Art sowie seiner wissenschaftlichen Passion stets motivierend auf mich gewirkt hat.

Darüberhinaus möchte ich herzlich Herrn Prof. Dr. Peter Koulen für seine wertvollen Anregungen und Tipps zur Planung meiner Doktorarbeit danken, Herrn Prof. Dr. Herbert Zimmermann und Frau Dr. Gabi Lahner, die im Rahmen des Graduiertenkollegs "Neuronale Plastizität" stets sehr bemüht waren, den Doktoranden in zahlreichen Seminaren und Workshops ein umfassendes Wissen in wissenschaftlichen und außerwissenschaftlichen Belangen begleitend zur Promotion zu vermitteln, Ben Marquez-Klaka für sein außerordentliches Engagement, einem Pharmazeuten die Kniffe der Molekularbiologie nahe zu bringen; Annette Nicke für die vielen Tipps rund um die Elektrophysiologie und Molekularbiologie und über Sein und Nichtsein in der Wissenschaft; Yussuf für die anregenden Gespräche an so manch langen Abenden im Labor sowie allen anderen Mitarbeitern, die mir mit Rat und Tat behilflich waren.

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern Ingrid und Gerd, meinem Bruder Henning, meiner Schwägerin Magali und meinem Neffen Raphael bedanken, die mich in allen Lebenslagen tatkräftig unterstützt und immer an mich geglaubt haben.

Persönliche Daten

Name: Christian Madry
Geburtsdatum: 13.01.1979
Geburtsort: Merseburg
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

09/1997 Abitur am Johann-Gottfried-Herder-Gymnasium,
Merseburg

Grundwehrdienst

09/1997-06/1998 Sanitätssoldat,
Luftwaffenversorgungsregiment 1, Erding

Studium

10/1998-10/2002 Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-
Universität Halle-Wittenberg in Halle/Saale
08/2000 1. Pharmazeutisches Staatsexamen
07/2001 Aufnahme in die Studienstiftung des deutschen
Volkes
09/2002 2. Pharmazeutisches Staatsexamen
10/2002-05/2003 Forschungspraktikum bei Professor Peter Koulen an
der University of North Texas, Health Science Center
at Fort Worth, Department of Pharmacology and
Neuroscience, Fort Worth, Texas, U.S.A.
06/2003-04/2004 Praktische Tätigkeit in der Apotheke Sauter (Singen)
und in der Adler-Apotheke (Gerbstedt)
05/2004 3. Pharmazeutisches Staatsexamen und
Approbation zum Apotheker

Promotion

06/2004 Beginn der Dissertation am Max-Planck-Institut für
Hirnforschung in Frankfurt/Main in der Abteilung
Neurochemie bei Prof. Dr. Heinrich Betz
06/2004-06/2007 Stipendiat des Graduiertenkollegs "Neuronale
Plastizität", J.-W.-Goethe-Universität Frankfurt/Main
seit 07/2007 Stipendiat der Max-Planck-Gesellschaft

Gesamtpublikationsliste

Madry C, Betz H, Geiger JRP and Laube B (2008) Supralinear potentiation of NR1/NR3A excitatory glycine receptors by Zn^{2+} and NR1 antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(34):12563-12568

Schuler T, Mesic I, **Madry C**, Bartholomäus I and Laube B (2008) Formation of NR1/NR2 and NR1/NR3 heterodimers constitutes the initial step in N-methyl-D-aspartate receptor assembly. *J Biol Chem* **283**(1):37-46.

Koulen P, **Madry C**, Duncan RS, Hwang JY, Nixon E, McClung N, Gregg EV and Singh M (2008) Progesterone potentiates IP(3)-mediated calcium signaling through Akt/PKB. *Cell Physiol Biochem* **21**(1-3):161-172.

Madry C, Mesic I, Betz H and Laube B (2007) The N-terminal domains of both NR1 and NR2 subunits determine allosteric Zn^{2+} inhibition and glycine affinity of N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol Pharmacol* **72**(6):1535-1544.

Madry C, Mesic I, Bartholomäus I, Nicke A, Betz H and Laube B (2007) Principal role of NR3 subunits in NR1/NR3 excitatory glycine receptor function. *Biochem Biophys Res Commun* **354**(1):102-108.

Koulen P, Liu J, Nixon E and **Madry C** (2005a) Interaction between mGluR8 and calcium channels in photoreceptors is sensitive to pertussis toxin and occurs via G protein betagamma subunit signaling. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**(1):287-291.

Koulen P, Wei J, **Madry C**, Liu J and Nixon E (2005b) Differentially distributed IP3 receptors and Ca^{2+} signaling in rod bipolar cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**(1):292-298.